



TITLE:

ウシ囊腫様黄体に関する研究(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

奥田, 潔

CITATION:

奥田, 潔. ウシ囊腫様黄体に関する研究. 京都大学, 1986, 農学博士

ISSUE DATE:

1986-07-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r6013>

RIGHT:

新	制
農	
44	
京大附図	

ウシ嚢腫様黄体に関する研究

1986

奥田 潔

ウシ嚢腫様黄体に関する研究

1986

奥田 潔

目 次

第1章 緒 論	----- 1
---------	---------

第2章 囊腫様黄体に関する形態学的な らびに内分泌学的検索	----- 7
----------------------------------	---------

第1節 緒 言	----- 7
---------	---------

第2節 囊腫様黄体の発生率と性周期 にともなう内腔の大きさの推 移	----- 10
---	----------

第3節 囊腫様黄体を構成する黄体細胞	----- 32
--------------------	----------

第4節 囊腫様黄体に関する内分泌学 的検討	----- 46
--------------------------	----------

第5節 小 括	----- 58
---------	----------

第3章 囊腫様黄体の黄体細胞中の proges- terone ならびに oxytocin に関す る免疫組織化学的研究	----- 61
--	----------

第1節 緒 言	----- 61
---------	----------

第2節	anti-11 α -hydroxyprogesterone-hemisuccinate-bovine serum albumin-rabbit serum を用いた免疫組織化学-----	64
第3節	嚢腫様黄体の progesterone ならびに oxytocin 産生細胞に関する免疫組織化学的研究-----	81
第4節	小 括-----	92
第4章	嚢腫様黄体が性周期と受胎に及ぼす影響-----	94
第1節	緒 言-----	94
第2節	嚢腫様黄体が性周期に及ぼす影響と次性周期における再現性-----	97
第3節	嚢腫様が受胎に及ぼす影響-----	106
第4節	小 括-----	117
第5章	総 括-----	119
	謝 辞-----	126

引用文献 ----- 127

英文要旨 ----- 135

第1章 緒 論

繁殖障害による乳牛の淘汰率は、年々増加の傾向にあり、酪農関係者にとって繁殖性の向上は、泌乳能力の向上とともに最大の関心事といえる。繁殖障害の予防あるいは治療を推進するためには、その原因を究明することが第一義的な課題であるが、繁殖障害の原因は、複雑多岐にあたっており、いまだに克服されない多くの問題が残されている。

Casida (1961) は、低受胎牛（リピードブリーダー）の主因が、胎芽の早期死滅にあることを明らかにし、その誘因として、遺伝因子、生殖器の感染、炎症、ホルモンの分泌異常、受精卵の細胞質的欠陥などを挙げている。そのうち、ホルモンの分泌異常と不受胎との関係は、ホルモンの種類、量、相互の均衡、あるいは作用時期が複雑微妙であり（百面鬼ら, 1975）、不明な点が多く残されている。中でも、嚢腫様黄体は、黄体機能不全として早期胚芽死の原因になる（McEntee, 1958; 金田

と松田, 1970; 金田ら, 1980) とも, ならない (Morrow et al. 1966; Donaldson and Hansel, 1968) とも報告され, 未だに一定の見解に至っていない。

ウシ黄体の内腔に関する報告は, Krupski (1917) を始めとし, 古くから見られる (McNutt, 1924; Hammond, 1927) が, 排卵せずに卵胞壁の黄体化した follicle lutein cysts (黄体嚢腫) と排卵後の黄体に内腔形成のある cystic corpus luteum (嚢腫様黄体) を明確に区別するようになったのは, 最近のことである (Dawson, 1964; Hansel, 1964; Morrow et al. 1966; 金田と松田, 1970; Grunert, 1982)。

数多くある嚢腫様黄体に関する最近の文献の中で, 統一した定義は, 「排卵後に形成される黄体の中心部に内腔を有するもの」という一項目だけで, その他の項目に関しては, 各研究の報告によって異なっている。嚢腫様黄体の内腔の大きさの定義に関しては, 直径 7 mm 以上 (McEntee, 1958; Staples et al. 1961;

Hansel, 1964; Horstmann, 1971), 1.0 cm 以上 (Morrow et al. 1966) あるいは, 1.6 cm 以上 (Dawson, 1959) など様々である。また, 内腔の存在時期に関して, McNutt (1924) は, ウシを剖検して, 発情後7日目までの黄体内腔を観察し, 8日目以後においても腔が存在した場合 "cyst" と表現している。また, Hammond (1927) は, 中心腔内の液体が発情後8日以内に吸収されたものは, 正常であると述べ, 最近では Grunert (1969) が, 生理的には, 排卵後4~5日で内腔は黄体組織で充填されるものであると述べている。このように, 嚢腫様黄体に対して, 統一した見解が得られない最大の理由は, 臨床的に黄体の内腔を客観的に診断することが出来ないことにある (Donaldson and Hansel, 1968)。

生体における内腔診断が困難である為, 現在見られる嚢腫様黄体に関する研究報告の大部分は, 屠殺後採取した材料に関するものである。組織学的検索では, 内腔形成の有無に

よって差がないとする報告 (McEntee, 1958) と、
内腔形成のある黄体では、大型黄体細胞が疎
であるという報告 (Hansel, 1959; Hansel and
Wagner, 1960; Horstmann, 1971; Horstmann et al.
1972) がある。また、黄体組織中 progesterone
含量は、嚢腫様黄体のほうが、内腔のない黄
体に比べ低い (Staples et al. 1961; Hansel, 1964;
Donaldson and Hansel, 1965, 1968; Donaldson and
Takken, 1969; Hoffmann, 1969) とされており、
嚢腫様黄体の機能の低下が示唆されている。
一方、嚢腫様黄体と内腔形成のない黄体の組
織培養 (Donaldson and Hansel, 1968), あるいは
細胞培養 (Stock, 1984, 1985) によつて、pro-
gesterone の産生分泌能に関して両者間に差が
ないことも示唆されている。生体内の内腔診
断が困難であるため、現在まで嚢腫様黄体を
有するウシの血液中 progesterone 濃度の測定を
行った報告は見られず、嚢腫様黄体の progeste-
rone 産生分泌機能に関しては、未だに不明な
点が残されている。

嚢腫様黄体の発生の原因は、黄体形成不全の観点から、下垂体からの LH 分泌不足が推測されている (McEntee, 1958; Greenstein, 1960) が、Snook et al. (1969) は、anti-LH-serum の投与によって黄体成長の抑制を誘発したが内腔の発生については、言及できなかった。また、Hansel (1959), Hansel and Wagner (1960), Hansel (1964), Donaldson et al. (1965), Donaldson and Hansel (1968) は、oxytocin 投与によって黄体の成長を抑制し、嚢腫様黄体の発生も認めているが、その発生機序は、明らかにされていない。

このように、嚢腫様黄体に関しては、機能低下を示唆する報告と、正常であるとする報告の両方が存在し、未だに結論が得られておらず、従って、治療の必要性の有無の解釈にも混乱がある。また、近年、盛んに行なわれている受精卵移植の際、受卵牛の黄体機能診断にも、内腔の有無は常に問題となっている。

そこで、本研究では、ウシ黄体の内腔形成が、黄体機能へ及ぼす影響、ならびに不受胎との関係を検討する目的で、まず屠畜材料ならびに生体材料について、形態学的、内分泌学的に検索し、ついで、免疫組織化学的に黄体細胞の progesterone と oxytocin 産生細胞についても、内腔形成の有無によって検討した。さらに、超音波断層診断装置を用いて、内腔形成が受胎に及ぼす影響について直接的に検討した。

第 2 章

囊腫様黄体に関する形態学的ならびに内分泌学的検索

第 1 節 緒 言

ウシ囊腫様黄体の発生率に関しては、多くの報告があるが、11%~34%と報告によって大きな幅がある (Krupski, 1917; Elder, 1925; McEntee, 1958; Mylrea, 1962; Donaldson and Hansel, 1968; Borowski, 1972; Cubic, 1972; Al-Dahash and David, 1977)。しかし、日本国内における発生率の報告は、現在まで見当らず。また内腔の消長に関しては、黄体内の内腔を客観的に観察することが不可能である。ために、継続的な観察の報告はなく、詳細に関してはまだ不明な点が残されている。

囊腫様黄体の機能を知る目的で、古くから組織学的な検索がなされているが、内腔を有する黄体に異常を認めたいという報告と、正常黄体の所見と変わりないという報告があり、

統一された見解がない (McEntee, 1958; Hansel, 1959; Hansel and Wagner, 1960; Horstmann, 1971, Horstmann et al. 1972)。また、嚢腫様黄体に関する内分泌学的な検索としては、Staples et al. (1961), Hansel (1964), Donaldson and Takken (1968) と Hoffmann (1969) らによつて黄体組織中 progesterone 濃度あるいは含量について、嚢腫様黄体では低いことが報告されているだけで、黄体の progesterone 分泌能力の指標となる末梢血中の progesterone 濃度に関する報告は見られない。

本章では、北海道十勝地方の内腔形成のある黄体の発生率と、発生から消失までの様子を超音波断層診断装置を用いて観察して、その発生意義を探索するとともに、内腔の発生要因として、midcycle follicle が関係しているかどうかについても検討した。さらに、内腔形成の有無によつて、黄体の機能に差があるのかを知る目的で、黄体を構成する各種黄体細胞の比率を調べ、内分泌学的には、黄体組

織中ならびに血清中の progesterone 濃度を内腔
形成の有無によつて比較した。

第2節 囊腫様黄体の発生率と性同期にもなる内腔の大きさの推移

本節では、ホルスタイン種乳牛における、内腔形成のある黄体の出現率、また、midcycle follicle と内腔出現との関係を検索し、さらに一定飼養管理下にあるウシ生体材料に対して、超音波断層診断装置を用いて、黄体内腔の消長を観察し、内腔発生の要因に関して検討した。

I. 材料および方法

本試験は、屠畜材料ならびに生体材料について行われた。

a) 屠場材料

1984年7月から1985年4月までの間に、屠畜場（帯広）においてホルスタイン種乳牛より、子宮に肉眼的異常の認められなかった個体の卵巣を採取した。妊娠時の卵巣を、子宮内の胎仔を確認した後採取したが、胎仔体長は、測定しなかった。材料としたウシの年齢

は、不明である。採取した卵巣は、非妊娠 627 対、妊娠 179 対、計 706 対であった。

非妊娠黄体を Ireland et al. (1980) と Okuda et al. (1984) の報告を参考に、以下のように
発展期黄体 (CL in developing, $n = 190$)、開花
期黄体 (fully developed CL, $n = 374$)、退行期
黄体 (CL in regression, $n = 63$) の 3 期に分
類した。

発展期黄体：黄体の表面には、まだ吸収し
きらない血液が認められ、黄体は非常に柔軟
性に富んでいる。卵巣表面より認め得る黄体
の直径 1.5cm 未満のもの。

開花期黄体：卵巣表面から突出しているも
の、あるいは、卵巣内に埋没しているものな
ど様々な形態を示すが、表面から血液は吸収
されている。黄体は、肉様で弾力性に富み、
卵巣表面より認め得る黄体の直径は 1.5cm 以
上。色は、褐色。

退行性黄体：黄体表面は、薄い結合組織で
被覆されており、弾力性は失われ堅い。色は、

黄色。

卵胞の記録として、直径1cm以上ある卵胞を記録した。黄体ならびに黄体内腔の大きさは、黄体の長軸にそって割を入れた後、次式で求めた。

$$\phi = \sqrt{\text{長径} \times \text{短径}} \quad (\text{mm})$$

b) 生体材料

実験に用いたウシは、専ら畜産大学附属農場で飼育されているホルスタイン種雌牛（1～13才）のべ78頭で、実験期間は1984年6月から1985年3月までで、飼養実験数は、約80頭の牛群である。牛群は、フリーストール式開放牛舎に年間を通して、主にコーンサイレージ・乾草の自由採食で飼育されている。未経産牛は、15ヶ月齢、350 kg以上のもの、経産牛は、生理的空胎期を経過したものを実験の対象とし、集嚙行動によって発情を確認した後、人工授精（AI）を行い、翌日に直腸検査によって排卵を確認した。

これらのウシについて、超音波断層診断装置を用いて、黄体をAI後 5日目ならびに10日目に観察した。そして、黄体に内腔が観察されたウシについては、引き続き16日目、21日目、以後2日おきに内腔の消失まで観察を続けた。

超音波断層診断装置は、アロカ社製SSD 210DX (東京) を使用し、これに犬動物直腸検査用5MHz走査探触子としてアロカ社製UST 5813-5を接続して走査を行った。走査の手順は、つぎに示す通りである。

1). 直腸検査用手袋内に走査用gelを注入し、空気の混入のないように、走査用探触子を手袋内に挿入する。

2). 直腸内の内容物を排除する。

3). 手とともに、1). の走査探触子を直腸内に挿入し、子宮、卵巣に刺激を与えぬように直腸壁を通して卵巣を走査する。

4). 黄体の内径を、長径、短径ともに、画像内の測定器で測定し、球形でない内腔の大

サイズを $\phi = \sqrt{\text{内腔の長径} \times \text{短径}}$ の式で求めた。

黄体のサイズに関する群間の比較を、北海道大学大型計算機センターの Statistical Analysis System (SAS) を用いて Duncan's multiple range test で行った。

II. 結 果

屠畜場で採取した黄体 ($n=706$) を、肉眼的所見から発展期 190 例、開花期 374 例、退行期 63 例、妊娠期 79 例の各群に分類して、内腔の出現率を見たところ、発展期 42.1 %、開花期 33.7 %、退行期 11.1 %、妊娠期 5.1 % で、各群間には有意差が認められた ($P < 0.01$)。また、内腔のサイズを、1 ~ 9 mm, 10 ~ 19 mm, 20 mm 以上に分類して出現率を調べたところ、どの黄体期においても 1 ~ 9 mm の内腔を有していたものが最も多く観察され、20 mm 以上は、黄体のサイズが最も大きな (Table 2) 開花期黄体においても、1.9 % (7/374) にすぎな

かった (Table 1)。妊娠黄体に見出された4例のうち1例は、内径19mmであった。内腔の見出されなかった開花期黄体、あるいは妊娠黄体の中に、中心部が結合組織で充填されているものがあった (Fig. 1)。

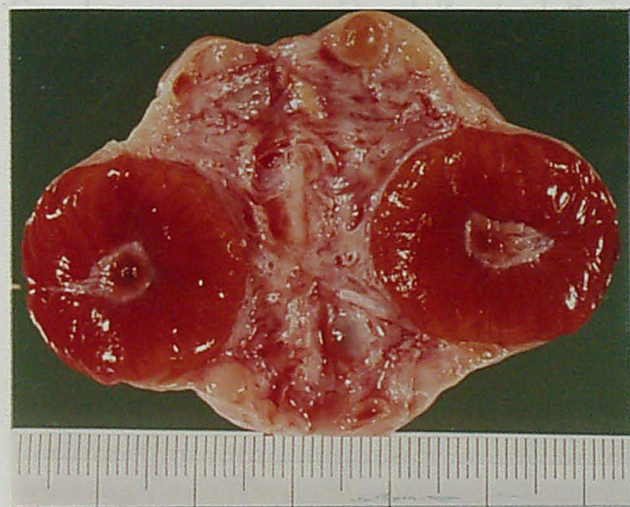


Fig.3. The plug of connective tissue at the center of corpus luteum in pregnancy

Table 1. Incidence of a central cavity in the corpora lutea (CL) in the various luteal phase

Size ¹ of cavity (mm)	Cyclic CL			CL
	Developing	Full developed	Regression	in pregnancy
0	110 (57.9%)	248 (66.3%)	56 (88.9%)	75 (94.9%)
1 - 9	51 (26.8%)	85 (22.7%)	6 (9.5%)	3 (3.8%)
10 - 19	25 (13.2%)	34 (9.1%)	1 (1.6%)	1 (1.3%)
> 20	4 (2.1%)	7 (1.9%)	0	0
Total	190 (100%)	374 (100%)	63 (100%)	79 (100%)

¹ Size of cavity (mm) = $\sqrt{\text{longest} \times \text{widest point}}$

採取した黄体の大きさを各黄体期で、内腔形成の有無によって検討したところ、発展期ならびに開花期の黄体は、内腔の径が大きくなるに従って有意に大きくなるが、退行期ならびに妊娠期の黄体は、内腔の有無にかかわらず、ほぼ一定の大きさであった (Table 2)。妊娠黄体と開花期黄体は、ほぼ同じ大きさであった。

次に黄体期に出現する卵胞 (midcycle follicle) と黄体内腔出現との関係を検討した。各黄体期における卵胞 ($\phi \geq 1.0 \text{ cm}$) の出現率は、発展期 80.4% (127/158)、開花期 93.7% (283/317)、退行期 80.4% (41/51)、妊娠期 59.6% (28/47) で (Table 3)、発展期黄体と開花期黄体に関して、内腔形成と卵胞出現との関係 (黄体内腔形成の有無による卵胞出現率の比較) では、発展期には、内腔形成が認められたウシに、卵胞を有しているものが有意に多く ($P < 0.01$)、開花期黄体においては、有意差は認められなかった。

Table 2. The size of CL (cm)* with and without a central cavity

Size * of cavity (mm)	Cyclic CL			CL
	Developing (n = 190)	Full developed (n = 374)	Regression (n = 63)	in pregnancy (n = 79)
0	1.8 ± 0.43 ^a (n = 110)	2.5 ± 0.24 ^e (n = 248)	1.7 ± 0.41 (n = 56)	2.6 ± 0.35 (n = 75)
1 - 9	2.0 ± 0.45 ^b (n = 51)	2.5 ± 0.27 ^f (n = 85)	1.8 ± 0.32 (n = 6)	2.8 ± 0.36 (n = 3)
10 - 19	2.3 ± 0.35 ^c (n = 25)	2.7 ± 0.25 ^g (n = 34)	1.9 (n = 1)	2.9 (n = 1)
> 20	2.9 ± 0.39 ^d (n = 4)	3.2 ± 0.45 ^h (n = 7)		

CL = Corpus luteum

* Size of cavity (mm) and size of CL (cm) = $\sqrt{\text{longest} \times \text{widest point}}$
a-d, b-d, c-d, e-h, f-h, g-h; P < 0.01, e-g; P < 0.05

生体材料について超音波断層診断装置を用いて定期的に観察した78例の黄体のうち、37.2% (29例) に内腔形成が認められた。内腔の最大時の大きさを、1~6 mm, 7~9 mm, 10~14 mm, 15~19 mm, 20 mm以上の各群に分けて出現率を見ると、Table 4に示す通りであった。7 mm以上の内径を有する黄体の出現率は、30.8% (24/78), 10 mm以上は、全体の24.4% (19/78)であった (Table 4)。

超音波断層診断装置による黄体の観察は、排卵後5日目から可能であったが、5日目の黄体像は、10日目に比べるとやや鮮明さに欠けた。排卵後10日目の黄体は、卵巣実質組織と明瞭に区別できた (Fig. 2)。

内腔は、AI 後5日目の観察時から、echo free spaceとして確認され、一部の例外を除いて10日目に最大径を示した。その後、16日目には、やや縮小した像が観察され、その後の観察で消失することが確認されたが、消失の時期は様々で、黄体内腔の大きさが、1~6

mm, 7 ~ 9 mm, 10 ~ 14 mm, の群では, 次性周期時には, ほとんどが消失していた (Fig. 3)。

内腔の径が10 mm以上のものでは, 消失までに, 排卵後21日目以後までかかり, 48日目まで存在したものも観察された。

III. 考 察

本節における屠畜場材料の観察で, 内腔を有する黄体の出現率は, 発展期42.1%, 開花期33.7%, 退行期11.1%, 妊娠期5.1%であり, 非妊娠例では, 排卵後, 日が浅い発展期黄体では多く観察され, 徐々に減, ていくことが明らかとなった。このことは, 本節で生体を用いた超音波断層診断装置での観察においても, 内腔内液はやがて吸収され, 内腔は縮小, 消失することが観察されたことと一致する (Fig. 3)。本章第1節で述べたように, 各研究者によって内腔の発生, 出現率の報告には, 11 ~ 34%と大きな開きがあるが, これらの差は, 嚢腫様黄体の定義が各個人によって

Table 3. Incidence of follicles in various luteal phases

Size of CL / Follicle cavity (mm)		Cyclic CL						CL in pregnancy (n = 47)	
		Developing (n = 158)		Fully developed (n = 317)		Regression (n = 51)		with	without
		with	without	with	without	with	without		
0		62	25	186	14	36	10	27	18
1 - 9		39	6	76	4	4	0	1	0
10 - 19		22	0	29	2	1	0	0	1
≥ 20		4	0	6	0	0	0	0	0
Total		127	31	297	20	41	10	28	19
		(80.4%)	(19.6%)	(93.7%)	(6.3%)	(80.4%)	(19.6%)	(59.6%)	(40.4%)

Follicle ≥ 1.0 cm CL = Corpus luteum

Table 4. Appearance of cavity in the CL

	Maximum size of cavity (mm)	No.	Appearance rate (%)	
CL with cavity	1-6	5	37.2	
	7-9	5		
	10-14	5	30.8	
	15-19	7	(≥7 mm)	24.4
	≥20	7		(≥10 mm)
CL without cavity		49	62.8	
Total		78	100.0	

CL = Corpus luteum

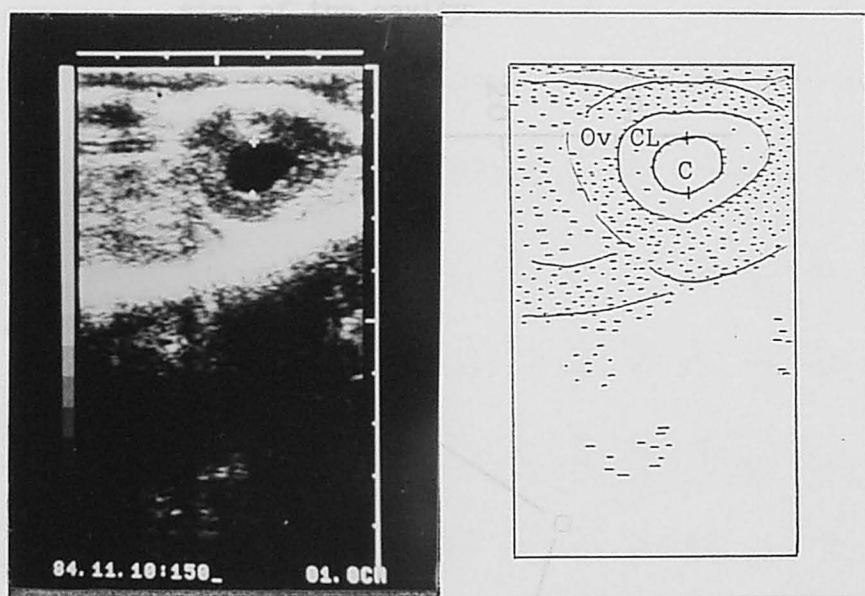


Fig.2. Ultrasound image of an ovary with corpus luteum on Day 10 after estrus. Corpus luteum is shown with a central cavity (nonechogenic area), 10 mm in size.

Ov-Ovary; CL-Corpus luteum; C-Cavity

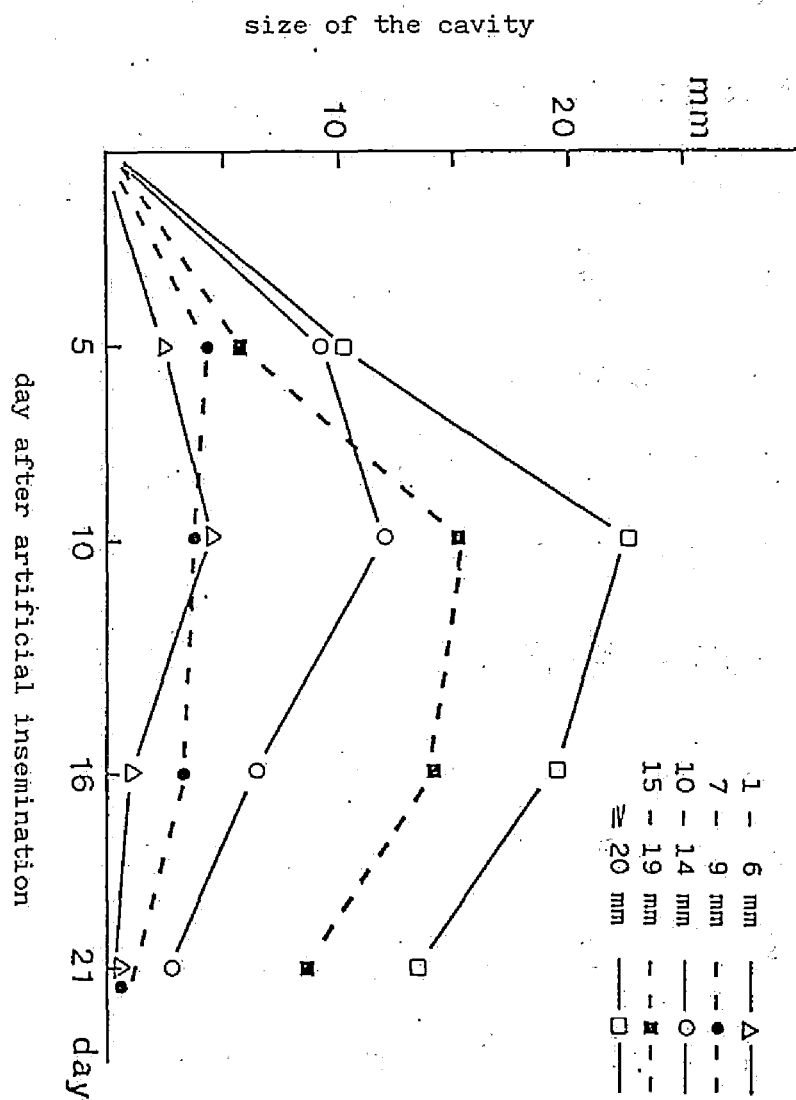


Fig. 3. Changes in the size of cavity in the corpus luteum

まちまちで、統一されたものが無いことによると思われる。本節における内腔の発生率が他の報告 (Krupski, 1917; Elder, 1925; McEntee, 1958; Mylrea, 1962; Donaldson and Hansel, 1968; Borowski, 1972; Cubic, 1972; Al-Dahash and David, 1977) と比べると高いのは、本研究では、内腔の大きさが 1mm 以上のものをすべて包括して検討している為であろう。

一般的に、グループ卵胞が排卵した後に形成される黄体の中心に内腔形成が見られた場合に、その黄体を cystic corpus luteum (嚢腫様黄体) と呼んでおり、排卵せずに卵胞壁が黄体化した follicle lutein cyst (黄体嚢腫) と区別している (Morrow et al. 1962; Dawson, 1964; Hansel, 1964; Grünert, 1982)。しかし、内腔の大きさや形態、あるいは存在時期などに関しては、定まった見解はない。

ウシの品種あるいは飼養形態と嚢腫様黄体の発生についての報告は、極めて少く、おそらく Resende et al. (1972) がスペインの zebu

cow には、囊腫様黄体の発生が少いと報告しているにすぎない。一方、Morrow et al. (1966) や Borowski (1972) は、季節と囊腫様黄体の発生率について触れ、2月～3月は少く、8月から1月には発生が多いと報告した。本節での生体を用いた観察は、6月から3月までの間に、一定の飼養管理下にあるウシを用いたが、各月の頭数が少く、季節と囊腫様黄体の発生状況を検討することはできなかった。これらの条件下での本節における発生率は、内径10 mm以上のものでも24.4%と高率であったが、発生率に関する報告は、10年以上も以前のものが大部分で、ここ10数年で急速に進展した乳牛の品種改良に伴う体算の変化、あるいは泌乳量の増加と飼養管理の不適合などは、発生率の増加に影響していることが推測される。

排卵直後の卵胞腔は、血液とともに液体で充たされている (Hammond, 1927)。このもとの卵胞腔が、いつ黄体組織によって充填されるか

についての報告は、様々である。Höflinger (1947) は、4日目と述べ、Rajakoski (1960) は、性周期の6~7日目、Gier and Marion (1961) は、排卵後6日目と述べている。本節での観察は、排卵後5日目が最初であったが、この時点で内腔形成の認められたものは、Fig. 3に示すように、10日目までその大きさを増し、その後、徐々に縮小、消失することが認められており、排卵後生理的に認められる内腔内の液体成分は4日目までに吸収され、黄体組織あるいは結合組織によって充填されるものと考えられる。Hansel (1964) は、発情後15日目の観察では、それ以前に比べると囊腔様黄体の発生が少いことより、黄体の内腔は、性周期がすすむに従って小さくなると推測した。

本節における超音波断層診断装置を用いた観察で、その推測が正しか、たことが明らかにされた。排卵後5日目における超音波診断装置を用いた観察では、黄体像が不明瞭であったのは、この時期では黄体形成がまだ不十

分であり、黄体組織が疎で水分含量が多いことによると思われる。

妊娠黄体、あるいは開花期黄体の中心に時々、結合組織の塊が認められた (Fig. 1) が、これは、Moss et al. (1954) が、組織学的検索で黄体内腔は線維芽細胞で埋められていくという報告を裏づけるものであった。また、妊娠黄体においても、内腔を有するものが4例観察され、うち一例は、内径が19 mmもあり、内径の存在が妊娠成立、維持に影響を与えないことが強く示唆された。しかし、嚢腫様黄体の機能については、組織学的 (本章第3節参照)、内分泌学的 (本章第4章参照) の検討が必要である。

臨床的に嚢腫様黄体を診断することは、極めて困難である (Dieter, 1967; Jordan, 1969; Borowski, 1972; Hornig, 1978) が、本節で、内腔の大きさが増すにつれて、黄体の大きさも有意に増したことから、大型の黄体が、内腔を有する可能性は高い。しかし、大型黄体で

も内腔を有していなかったものも多数認められた。

Hornig (1978) は、生前に行った直腸検査所見と剖検とを比較して、嚢腫様黄体では、78.6% (11/14) という高い設診率があったことを示しており、直腸検査で内腔形成を診断することは避けるべきであろう。

本間と須川 (1960) ならびに金田と松田 (1970) は、臨床的に嚢腫様黄体を検索し、黄体期に出現する卵胞 (midcycle follicle) が、嚢腫様黄体を有するウシには多いことより、黄体形成不全にともなう progesterone 不足、卵胞発育による estrogen 量の過剰を不妊症の原因として推測している。本研究では、各黄体期における卵胞 ($\phi \geq 1.0 \text{ cm}$) の出現率は、発展期 80.4%、開花期 93.7%、退行期 80.4%、妊娠期 59.6% であった (Table 3)。発展期黄体では、内腔形成のあった群に卵胞が出現するものが有意に多く ($P < 0.01$)、開花期においては、両者間に有意差はなかった。卵胞が、 $\text{estradiol-17}\beta$ を中心とする estrogen の産生分泌

を行なっており、卵胞が黄体退行に関与していることについては、多くの報告がある (Karsh et al. 1970; Ginther, 1971; Dufour et al. 1972; Ireland et al. 1979; Matton et al. 1981; Staigmiller and England, 1982; Ireland et al. 1984)。最近では、Fogwell et al. (1985) が、特に黄体期に出現する卵胞 (midcycle follicle) は estradiol-17 β 産生源であり、子宮からの PGF $_{2\alpha}$ の分泌に作用し、黄体の退行がおこることを示唆している。本研究では、発情期黄体で卵胞の出現が、内腔形成の見られた群に有意に多かったが、その原因は不明である。しかし、開花期においては、卵胞の出現率に内腔形成の有無によって差は認められず、Fogwell et al. (1985) の報告と合わせて考えると、嚢腫様黄体を、卵胞出現の面から不妊症に関連させて考えるには無理があると思われる。

本節では、非妊娠の各黄体期において、内腔形成は、高率に観察されるが、やがて内腔は、吸収、消失することが明らかとなった。

また、吸収後の内腔は、黄体組織と結合組織
によつて充填されることが示され、内腔を有
している黄体でも妊娠が成立し、維持される
ことが示唆された。

第3節 嚢腫様黄体を構成する黄体細胞

前節において、黄体の中心に存在する内腔は、やがて消失することが明らかとなり、また妊娠黄体にも内腔の存在が認められたことより、内腔を持つ黄体の機能は、内腔のない黄体と比べて差がないことが示唆された。しかし、嚢腫様黄体を組織学的に検索した Hansel (1959), Hansel and Wagner (1960), Horstmann (1971), Horstmann et al. (1972) らは、開花期黄体における大型細胞の密度は、内腔形成のあった黄体のほうが、内腔形成のない黄体に比べて疎であると報告し、機能の低下を示唆している。本節では、内腔形成の有無によって、黄体機能に差があるのかを検討する目的で黄体を構成する黄体細胞の比率を検索した。

I. 材料および方法

屠畜場において、ホルスタイン種乳牛より

子宮に肉眼的異常、あるいは胎芽、胎仔の認められない個体の卵巣から、前節での分類による開花期黄体を材料として採取した。黄体の長軸に添って割を入れ、内腔形成のあった黄体 ($n=15$) となかった黄体 ($n=10$) に分類した。内腔を有する黄体は、さらにその内径の大きさ ($\phi = \sqrt{\text{長径} \times \text{短径}}$) によって、 $1 \sim 9 \text{ mm}$ ($n=5$)、 $10 \sim 19 \text{ mm}$ ($n=5$)、 20 mm 以上 ($n=5$) の各群に分類された。黄体組織を中央部より切り出し、中性ホルマリン液にて固定、パラフィン包埋の後、約 5μ に薄切、常法に従い脱パラフィン後、ハマトキシリン-エオジン重染色 (HA-staining) を施し、組織学的検索を行った。

黄体細胞の分類

Foley and Greenstein (1958) のウシ黄体細胞、Thweites and Edey (1970) のヒツジ黄体細胞の分類を参考に次の I ~ V 型に分類した。

I 型；細胞の核は、1 ~ 数個の明瞭な核小体を有し、球状で中心に位置する。細胞の大

きさは、II型の約 $\frac{1}{2}$ ~ $\frac{1}{3}$ で、II型の細胞よりも細胞膜に緊張感が少ない。細胞中、核の占める面積の割合が多く、細胞質が少い (Fig. 4a)。

II型；細胞は、核膜、細胞膜ともに緊張感があり、核には1~数個の核小体を有する。細胞は大きく、細胞質は均質に明るく染まり細胞の形は、卵円形または円形である (Fig. 4b)。

III型；細胞は、細胞膜と核膜の両方が収縮し、隣接細胞との間に空隙を有している。核膜収縮の結果、不明瞭となった核の中には、顆粒性で粗、かつ無構造な核小体を有する。細胞膜は、ときとして不明瞭である (Fig. 4c)。

IV型；細胞は、星形あるいは細長で、過色素の核を有している。細胞質は少く、染色性は様々で、通常は濃染する (Fig. 4d)。

V型；細胞質は、極めて少なく、濃染する。核濃縮は顕著となり、細胞は、不定型である (Fig. 4e)。

Fig. 4

a: Type I luteal cell. HE-staining, x 630.

Type I luteal cells have round, centrally located vesicular nuclei with one or more prominent nucleoli. They are approximately half the size of Type II cells.

b: Type II luteal cell. HE-staining, x 630.

Type II luteal cells have large, round, vesicular, centrally located nuclei, distinct nuclear membranes, and one or more prominent nucleoli. The cells are plump, rounded and have lightly staining cytoplasm.

c: Type III luteal cell. HE-staining, x 630.

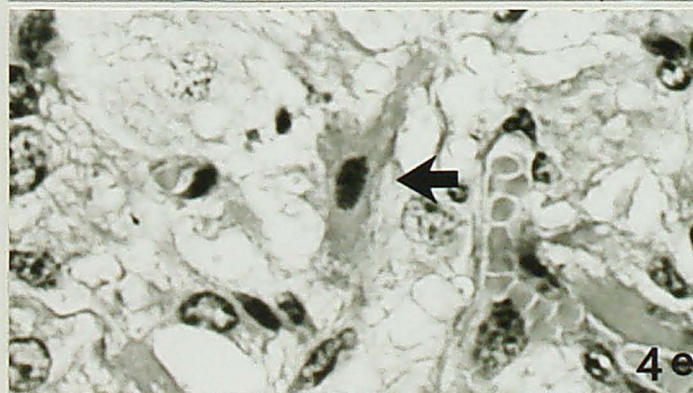
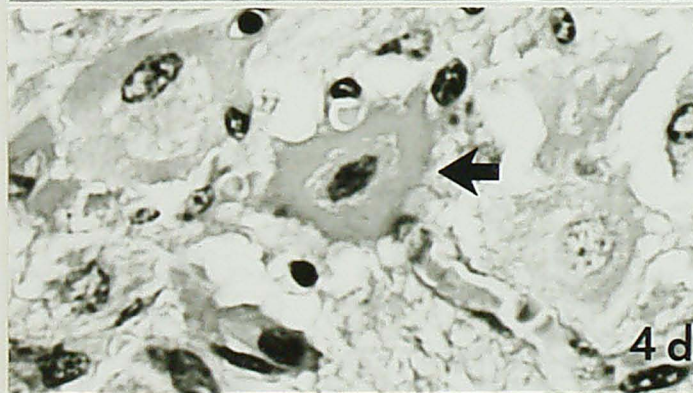
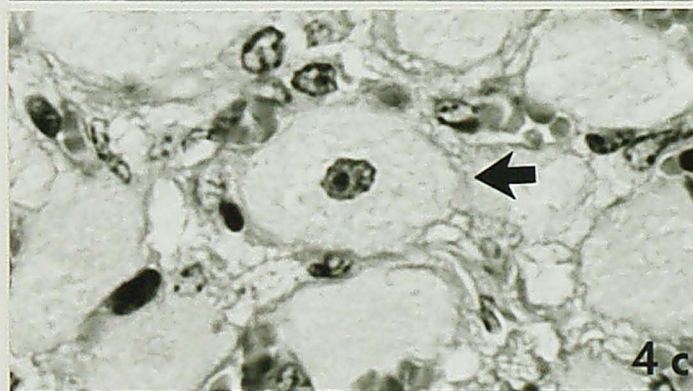
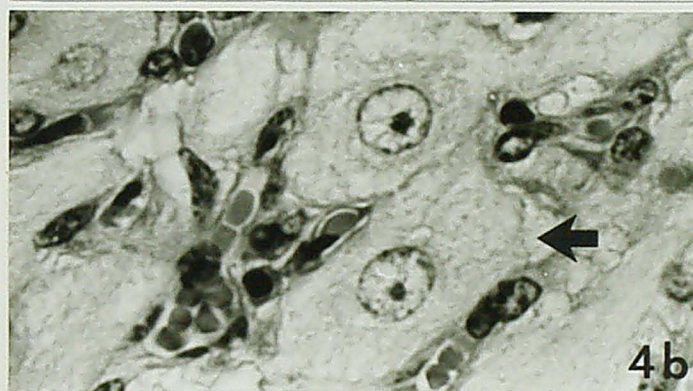
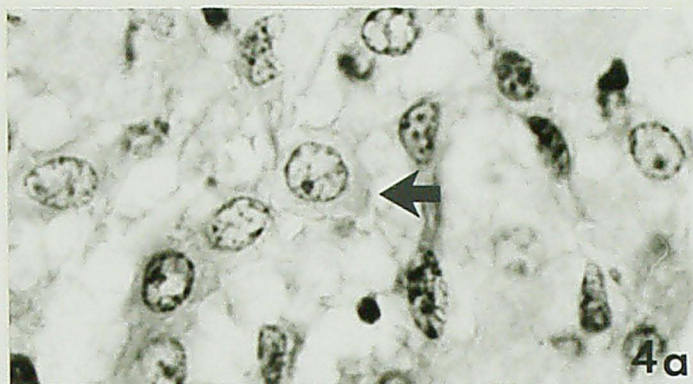
Both the cell wall and nuclear membranes are shrunken. The nucleus is coarsely granular and has an irregular outline.

d: Type IV luteal cell. HE-staining, x 630.

Type IV luteal cells are rapidly identifiable by intense and diffuse staining of their cytoplasm, stellate appearance and their hyperchromatic nuclei.

e. Type V luteal cell. HE-staining, x 630.

Type V luteal cells are the smallest luteal cells and possess small, dense nuclei typical of pyknotic cells.



黄体細胞の算定方法

接眼レンズの中に、方眼5mmのレンズを入れ、視野に等間隔に36の点を有するようにした。視野は、無作為に選ばれ、黄体細胞をⅠ～Ⅵ型まで分類しながら500個数えた。数え終るまでに要した視野の数も同時に算定した。

細胞は、点が細胞内に含まれているか、あるいは点が、細胞に接している場合にものみ、その細胞を1として数えた。核が不明瞭、あるいは、無核の黄体細胞などは、型分けが不可能な為に、Ⅶ型として別に数えた。

黄体細胞の算定方法は、つぎのとおりである。

- 数えた黄体細胞総数(500)に対する各型黄体細胞の占める割合(%)

$$= \frac{\text{各型別の黄体細胞数}}{\text{黄体細胞総数(500)}} \times 100$$

- 黄体組織中、黄体細胞の占める割合(%)

$$= \frac{\text{全黄体細胞総数(Ⅰ～Ⅵ)}}{\text{全視野数} \times 36} \times 100$$

得られた結果に関する群間の比較は、尤度検定によつて行つた。

II. 結 果

全黄体組織 (Corpus luteum tissue) 中、黄体細胞 (luteal tissue) の占める割合は、内腔形成のあった黄体に関しては、内腔の大きさが 1 ~ 9 mm の群 60.4 % , 10 ~ 19 mm の群 56.7 % , 20 mm 以上の群 60.2 % , そして内腔のない黄体群 62.9 % であった (Table 5) 。内腔を有さない黄体のほうが、おずかに黄体細胞の占める割合が多い傾向が認められたが、各群間には有意差は認められなかった。

次に、5つの型に分類した各黄体細胞の占める割合を検討したところ、I型の黄体細胞の占める割合は、内腔の大きさにかかわらず、内腔形成のあった黄体のほうが、内腔を有していない黄体に比べて有意に多かった (Table 6) 。II型の黄体細胞は、逆に、内腔の大きさが、10 ~ 19 mm の群を除いて、内腔を有

Table 5. Luteal tissue in fully developed CL with and without cavity

Full developed CL	Diameter of cavity (mm)	n	Luteal tissue in CL (%)*
With cavity	1 - 9	5	60.4 ± 10.11
	10 - 19	5	56.7 ± 10.09
	> 20	5	60.2 ± 7.79
Without cavity		10	62.9 ± 4.86

* 100% = Luteal tissue + connective tissue + blood vessels

CL = Corpus luteum

Table 6. Classification of luteal cell types in fully developed CL with and without cavity

Fully developed CL	Size of cavity(mm)	n	Luteal cell types(%)*				
			I	II	III	IV	V
With cavity	1 - 9	5	37.5 ^a ± 6.69	46.6 ^e ± 6.37	9.8 ± 5.24	5.5 ± 3.52	0.6 ± 0.91
	10 - 19	5	28.9 ^b ± 5.64	52.7 ± 10.42	12.6 ± 5.06	5.1 ± 3.86	0.7 ± 0.85
	> 20	5	35.3 ^c ± 9.82	45.3 ^f ± 6.36	11.1 ± 7.19	6.4 ± 5.13	1.9 ± 1.15
Without cavity	0	10	23.5 ^d ± 4.56	53.5 ^g ± 5.00	14.6 ± 3.97	6.1 ± 3.27	2.3 ± 2.63

*100% = luteal cells + connective tissues + blood vessels

a-b, c-d, e-g, f-g; p < 0.05, a-d; p < 0.01 (t-test)

している黄体のほうが有意に多かった。しかし、I型とII型の割合を加えて、群間の比較を行ったところ、有意差は認められなかった。III型、IV型ならびにV型の黄体細胞の出現率に各群間で有意差は認められなかった。

III. 考 察

ウシ黄体は、卵胞の顆粒膜層 (granulosa layer) と卵胞膜の内莖膜 (theca interna) の両層由来の黄体細胞で形成されている (Donaldson and Hansel, 1965; Friedkalns et al. 1968; Alila and Hansel, 1984)。そして、最近の研究では、ウシ黄体を構成する細胞は、便宜的に大型黄体細胞、小型黄体細胞の2種類に分類されている (Friedkalns et al. 1968; Ursely and Leymarie, 1979; Koos and Hansel, 1981; Alila and Hansel, 1984)。

本研究においてI型の黄体細胞の占める割合は、内腔の大きさにかかわらず、内腔形成のあった黄体のほうが、内腔のない黄体に比

べて有意に多く，Ⅱ型の黄体細胞は，逆に，
内腔を持たない黄体のほうが有意に多かった
(Table 6)。Ⅰ型は主に progesterone の産生に関
与し，Ⅱ型ならびにⅢ型は，産生ならびに分
泌の両方に活発であるという，Okuda et al. (19
84) の報告から考えると，嚢腫様黄体は pro-
gesterone の産生が，内腔のない黄体に比べて
多く行われていることが示唆されるが，Ⅰ型
ならびにⅡ型両細胞を加えた割合は，両群間
に差が認められなかったことより，内腔を持
たない黄体においてⅡ型の細胞が progesterone
産生のためにⅠ型細胞を補っている可能性も
考えられる。本節においては，個々の細胞
，あるいは嚢腫様黄体の構成細胞の progesterone
産生分泌能に直接触れることはできないが，
Stock (1984, 1985) は，嚢腫様黄体と内腔を持
たない黄体の黄体細胞を *in vitro* で培養して
progesterone の分泌能を比較し，ホルモン(LH
，HCG，PGE₂，PGF_{2α}) を添加する前では，
両者間に差はないが，ホルモン添加後では，

嚢腫様黄体のほうで progesterone 分泌が少なかったと報告し、Donaldson and Hansel (1965) は、正常黄体では、小型の黄体細胞はゴナドトロピンに反応して大型細胞に成長すると述べていることより、嚢腫様黄体の小型黄体細胞の多くが発展期に生体内でのゴナドトロピンに充分反応できなかったか、あるいは下垂体のゴナドトロピン分泌異常の可能性も示唆される。一方、Zimbelman et al. (1961) は、I型とII型を活発な黄体細胞として包括して、黄体機能に活発に関与していると述べている。本検索において、I型とII型を加えた割合では、内腔の有無によって差が認められなかったことより、嚢腫様黄体と内腔のない黄体間には、機能上差がないことが示唆される。しかし、黄体機能を直接的に論ずる為には、内分泌学的検索（本章第4節参照）を怠らなければならない。

Hansel (1959), Hansel and Wagner (1960), Donaldson and Hansel (1965), Horstmann (1970),

Horstmann et al. (1972) らは、自然発生あるいは、オキシトシン投与によって人工的に発生させた嚢腫様黄体を組織学的に検索し、結合組織の高い分布と、大型黄体細胞の密度が疎であると述べている。本検索では、point counting method により、黄体細胞の占める割合を検討したが、明らかに内腔を有する黄体のほうが結合組織(100% - 全黄体細胞の占める割合)の多い傾向が認められたが有意差は認められなかった (Table 5)。大型黄体細胞は、本検索では、II型の一部とIII型であるが、内腔の有無によって、大型黄体細胞の分布に差は認められなかった。

McNutt (1924), Rajakoski (1960), Uebershäre (1961), Priedkalns et al. (1968) らは、内腔と黄体組織のカアセルを見出しているが、本検索においても、大きい内腔を有する程、明瞭なカアセルが形成されており、内腔を有していない黄体でも結合組織の plug の形成があるものが散見され、内腔は、線維芽細胞で徐々に

埋められていくという Moss et al. (1954) の推測
を裏づける結果が得られた。

本節では、内腔形成の有無によつて、全黄
体細胞の占める割合に差がなく、また、活潑
な黄体細胞である I 型と II 型の黄体細胞を加
えた割合に両者間で差がなかったことより、
嚢腫様黄体は、機能上、内腔のない黄体と差
がないと考えられる。

第4節 嚢腫様黄体に関する内分泌学的検討

本章第2節ならびに第3節において、内腔形成のあった黄体が形態学的に内腔を持たない黄体と差異がないことを示してきた。

黄体は、周期性黄体でも妊娠黄体でも progesterone の産生と分泌が主な働きである。progesterone は、gestagen の中でも最も生理作用が強いステロイドホルモンで、妊娠の成立から後期にいたるまで、その産生分泌源をほとんど黄体に依っている (McDonald et al. 1953; Estergreen et al. 1967; Erb et al. 1968; Okuda, 1982; Wendorf et al. 1983)。

Staples et al. (1961), Hansel (1964), Donaldson and Hansel (1965, 1968), Donaldson and Takken (1969), Hoffmann (1969) らは、内腔を有する黄体の黄体組織中 progesterone 含量が低いことを報告し、嚢腫様黄体の機能が充分でないことを示唆している。しかし、臨床的に嚢腫様黄

体の診断が極めて困難であったため、これらの報告の中にも囊腫様黄体を有するウシの末梢血液中の progesterone 濃度を測定した報告は見られない。

本節では、内腔形成のある黄体と、ない黄体の progesterone 産生分泌機能に差があるかどうかを検討した。

I. 材料および方法

a. 黄体組織中 progesterone 濃度の測定

屠畜場において、ホルスタイン種乳牛より子宮に肉眼的異常あるいは、胎芽、胎仔の存在が認められなかった個体の卵巢から、第2節で述べた分類による開花期黄体を採取した。屠殺後15分以内に採取した黄体を、長軸に添って割を入れた後、内腔形成のある黄体 ($n=41$) と、ない黄体 ($n=10$) に分類した。内腔形成のある黄体を、さらにその内径の大きさ ($\phi = \sqrt{\text{長径} \times \text{短径}}$) によって、1

～9 mm ($n = 15$), 10～19 mm ($n = 20$), 20 mm 以上 ($n = 6$) の各群に分類した。

黄体組織を、中央部 (Okuda et al. 1984) より切り出し、50～100 mg の大きさに細切し、正確に重量を測定ののち、メチルアルコール約 5 ml を含む試験管内に密閉保存した。黄体組織中 progesterone 濃度の測定のため、ガラスモモゲタイガーで黄体組織を摩砕したのち、全体量が 10 ml になるようにメチルアルコールを追加し、遠心分離の後、上清を progesterone 測定に用いた。progesterone の測定は、Makino (1973) の方法に従い、Radioimmunoassay (RIA) によ、て行った。結果の progesterone 濃度を $\mu\text{g/g}$ で表した。

b. 末梢血清中 progesterone 濃度の測定

実験に用いたウシは、帯広畜産大学附属農場で飼育されているホルスタイン種乳牛（年齢 1～13 才）68 頭で、飼養形態は、本章第 2 節で述べた通りである。なお、未經産牛は分娩後、生理的空胎期を経過したもののみを、

実験の対象とした。

集羣行動によつて発情を確認の後、人工授精 (AI) を行い、翌日に直腸検査によつて排卵を確認した。AI 後 10 日目に超音波断層診断装置を用いて黄体の観察を行い、黄体の中心に内腔が認められたウシ ($n=29$) と認められないウシ ($n=39$) から、尾静脈より採血を行った。超音波装置の器具および使用法は、本章第2節に述べた通りである。なお、内腔の大きさを、本章第2節で述べた方法で求め、その大きさによつて、1 ~ 6 mm ($n=5$)、7 ~ 9 mm ($n=5$)、10 ~ 14 mm ($n=5$)、15 ~ 19 mm ($n=7$)、20 mm 以上 ($n=7$) の各群に分類した。採取した血液を、ただちに 4°C 、3000 rpm、10 分間遠心分離し、progesterone 測定まで -20°C で保存した。progesterone の測定は、Makino (1973) の方法に従い RIA 法で行った。得られた結果の群間の比較を、t 検定によつて行った。

II. 結 果

黄体組織中の progesterone 濃度を測定したところ、内腔形成のあった黄体の黄体組織中 progesterone 濃度は、内腔の大きさにかかわらず、内腔のない黄体に比べて有意に低かった (Table 7)。しかし、内腔を有している群間では、10 ~ 19 mm の群は、1 ~ 9 mm の群に比べて、黄体組織中 progesterone 濃度は、有意に高い値を示した。

AI 後 10 日目における血清中 progesterone 濃度は、内腔形成のあった群で 3.01 ± 0.97 ng/ml、内腔のない群で 3.12 ± 0.98 ng/ml と、両群間に有意な差は認められなかった。内腔形成のあった群の中で、内腔の大きさによる比較では、内腔の大きさが 10 ~ 14 mm の群でやや低値を示したが、どの群間にも有意差は認められなかった (Table 8)。

III. 考 察

Hansel (1964) は、性周期 7 日目ならびに 11 日目の嚢腫様黄体中総 progesterone 含量、ならびに

Table 7 Progesterone concentration in fully developed CL tissues, with and without cavity (Mean \pm SD)

Fully developed CL	Size of cavity (mm)	n	Progesterone in CL (μ g/g)
With cavity	1 - 9	15	46.1 \pm 20.17 ^a
	10 - 19	20	65.1 \pm 24.50 ^b
	\geq 20	6	50.9 \pm 38.75 ^c
Without cavity	0	10	97.9 \pm 54.42 ^d

a-b, a-d, b-d : P < 0.01, c-d: P < 0.05

a-c, b-c : not significant; CL = Corpus luteum

Table 8. Progesterone concentration in blood on Day 10 after artificial insemination

	Maximum size of cavity (mm)	No.	Mean progesterone (ng/ml)	Mean \pm SD
CL with cavity	1-6	5	3.36	3.01 \pm 0.97 ^a
	7-9	5	3.06	
	10-14	5	2.60	
	15-19	7	3.10	
	≥ 20	7	2.94	
CL without cavity		39 ^b	3.12	3.12 \pm 0.98 ^a

^a There was no significant difference.

CL = Corpus luteum

濃度は、ともに正常黄体のものより低かったと述べ、Donaldson and Hansel (1968) は、性周期7日目における嚢腫様黄体中の progesterone 含量について同様の報告をしている。また西論文とともに性周期4日目の黄体では、内腔の有無によつて差がないと述べている。

本検索では、内腔形成のあった開花期黄体の黄体組織中 progesterone 濃度は、内腔の大きさにかかわらず内腔を有さない黄体に比べて有意に低いことより、内腔形成のある黄体は、progesterone 産生機能の低下を示していることが示唆された (Table 7)。しかし、内腔形成のあった群間において、10~19 mm の群は、1~9 mm の群に比べて黄体組織中 progesterone 濃度は、有意に高い値を示しており、内腔の大きさと黄体の機能低下の間に、相関は認められなかった。Staples et al. (1961) は、発情後15日目で embryo が生存していくためには、黄体組織中総 progesterone 含量は、最低 100 μ g なければならぬとしている。本検索では、黄体重量を

測定しなかったために黄体組織中総 progesterone 含量を求めることはできなかったが、Okuda et al. (1984) は、開花期黄体の重量は約 5 g であると報告し、Grunert (1969), Theisen (1970), Cubic (1972), Okuda (1982) は、開花期の囊腫様黄体の重量は、内腔液を排除しても約 5 g あるいはそれ以上であると報告しており、これらの報告を総合すると、発情後 15 日目（黄体開花期）に embryo が生存していくために必要な黄体組織中 progesterone 濃度の下限は、約 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ ということになる。本検索で、 $20 \mu\text{g}/\text{g}$ 以下の例は、内径 10 ~ 19 mm の群 ($n=20$) に 1 例、20 mm 以上の群 ($n=6$) に 1 例存在していたが、それぞれの群に $100 \mu\text{g}/\text{g}$ を越える例もあった。このように、内腔を有する黄体にも、個体間に大きな差があることより、内腔の大きさから、その黄体機能を推測することは困難である。

本検索において、AI 後 10 日目における血清中 progesterone 濃度は、黄体に内腔形成のあった

牛群で $3.01 \pm 0.97 \text{ ng/ml}$, 内腔形成がなかった牛群で $3.12 \pm 0.98 \text{ ng/ml}$ であり, 両群間に有意な差は認められなかった (Table 8)。

Erb et al. (1976) は, AI 後 6 日目以後の血漿中 progesterone 濃度を測定し, 受胎した群は, 不受胎であった群に比べて高かったこと ($P < 0.01$) を報告し, Hansel (1981) も同様に AI 後 10 ~ 18 日の間の血漿中 progesterone 濃度が受胎群で高かった ($P < 0.01$) と述べている。また, 一方では, 受胎群と不受胎群では, AI 後の末梢血中あるいは乳汁中の progesterone 濃度にほとんど差がないという報告 (Bulman and Lamming, 1978; Roche et al. 1985) もあり, 末梢血中あるいは乳汁中 progesterone 濃度から, 受胎と不受胎群間の比較によって受胎能力の検定をすることは困難とされている。本検索では, 内腔形成の有無によって差が認められず, 内腔形成が末梢血中への progesterone 分泌を抑制していたことが示唆された。Stock (1984, 1985) は, 内腔形成のある黄体とない黄体の黄体細胞を培養し, pro-

gesterone の基礎分泌に差がないと報告しており、同様の考察を行っている。

Maurer and Echterkamp (1982) は、AI 後 13 日間の progesterone 濃度と胎芽の状況を観察し、正常胚芽の回収された牛群のほうが、未受精卵や変性胚芽の回収された牛群よりも、AI 後 6 日目における progesterone 濃度が高かった ($P < 0.05$) と報告している。また、最近では、受精卵移植時における受卵牛の血清中 progesterone 濃度に関する報告で、受胎した群のほうが、不受胎に比べて高かったことが認められている (Remsen et al. 1982; Bosu and Leslie, 1984)。また、中尾ら (1985) は、AI 後の乳汁中の progesterone 濃度を測定し、受胎例と不受胎例について、濃度に関する群間の比較だけでなく、progesterone 濃度の変動型について検討し、不受胎例には、黄体期の中間に progesterone 濃度が一過性に低下するものや、排卵後、progesterone 濃度の上昇が 3 ~ 4 日遅延する例が多いと報告している。本検索では、AI 後 10 日目のみに関する比較で

差が認められなかったが、嚢腫様黄体の内分泌学的意義を知るためには、継続して採血を行い、変動型を模索する必要があるかも知れない。ステロイドホルモンは、産生されると即座に分泌されると一般的に述べられており (Williams, 1983)、本模索の結果で、内腔形成のない黄体に比べ progesterone 産生量 (黄体組織中 progesterone 濃度) の少い、嚢腫様黄体が、どうして同量の progesterone を分泌できるかは不明である。内腔形成のある黄体の機能、あるいは、いわゆる黄体機能不全に関しては、progesterone 以外の steroid 系、あるいは peptide 系ホルモンも含め、多面的に検討する必要があると思われる (第3章参照)。

本模索における結果から、内腔形成のある黄体は、progesterone 産生に関しては、内腔のない黄体に比べやや劣っているが、分泌能に関しては差がないことが明らかとなった。

本章では、ウシ嚢腫様黄体の病的要因を検討する目的で、まず内腔形成のある黄体の発生状況、midcycle follicle との関係、超音波断層診断装置を用いて、内腔の発生から消失までの状況を観察し、ついで、内腔形成のある黄体と、ない黄体との間に、機能の差があるのかどうかを知る目的で、組織学的、ならびに内分泌学的に検索した。得られた結果は、つぎの通りである。

1、屠畜場材料において内腔形成のある黄体の発生率は、発展期 42.1 %、開花期 33.7 %、退行期 11.1 % であり、排卵直後では、半数近くの黄体に内腔形成が見られるが、徐々に消失していくことが示された。また超音波断層診断装置を用いて、黄体内腔を継続的に観察し、内腔は、排卵後 10 日頃に最大となり、大部分が次発情時には消失することが、明らかとなった。屠畜材料において、妊娠黄体で

内径 1.9 cm のものが観察され、内腔を形成する黄体でも、妊娠維持する例があることが示された。

2. midcycle follicle ($\phi > 1.0$ cm) の出現と、内腔形成のあった黄体との関係は、発展期黄体では、内腔形成のあった群に、卵胞の出現が有意に多かったが、開花期黄体では、内腔形成の有無によって、卵胞出現率に有意差は認められなかった。midcycle follicle の出現は、生理的なもので、黄体内腔の形成、あるいは不妊症の原因とは、関係がないと考える。

3. 黄体細胞を形態によって、I ~ V の 5 つの型に分類し、開花期黄体に関して、内腔形成の有無によって、各型の細胞の出現率を検討したところ、内腔形成のある黄体では、I 型細胞は有意に多く、II 型細胞は有意に少なかったことより、内腔形成のある黄体のゴナドトロピンへの反応能の低下あるいは、下垂体のゴナドトロピン分泌異常の可能性が示唆されたが、I 型と II 型を加えた割合や、他

型の細胞の出現率には、両群間に差が認められず、内腔形成の有無による黄体機能に差がないと考える。

4. 黄体組織中 progesterone 濃度を、内腔形成の有無によって、開花期黄体に関して検討したところ、内腔の大きさにかかわらず、内腔形成のあった黄体のほうが有意に低く、内腔形成のあった黄体の progesterone 産生機能の低下が示唆された。しかし、AI 後 10 日目における血清中 progesterone 濃度を、黄体に内腔形成のあった牛群と、内腔をもたない牛群間で比較したところ、両群間に有意な差は認められず、progesterone 分泌機能に関しては、差がないことが示唆された。

第 3 章

囊腫様黄体の黄体細胞中 progesterone ならびに oxytocin に関する免疫組織化学的研究

第 1 節 緒 言

前章第 3 節において、周期性開花期黄体について、内腔形成の有無によって、これらを構成している黄体細胞の出現率に、おずかに差を認めたが、その機能へ与える影響について考察を加え、また同章第 4 節では、末梢血中 progesterone 濃度は、内腔を形成する牛群と、内腔を形成しない牛群の間に差がないのに、黄体組織中 progesterone 濃度は、内腔を有する黄体のほうが有意に低いことが示された。この理由は不明で、黄体細胞の progesterone 産生分泌能に関しては、未だ不明な点が多く残されている。

Okuda et al. (1984) は、周期性黄体について、5つの型に分類した黄体細胞の出現率と、血漿中ならびに黄体組織中 progesterone 濃度との関

係を調べ、小型であるⅠ型黄体細胞は主として progesterone の産生に関与し、中型、大型であるⅡ型、Ⅲ型の黄体細胞は、progesterone の産生と分泌の両方に関与していることを示し、

Guidenaar et al. (1984) は、ウシ黄体を免疫組織化学的に検索し、大型黄体細胞中に抗-oxytocin-血清に陽性反応を示す免疫活性物質を認め、ウシ大型黄体細胞における oxytocin 産生を示唆した。ウシにおいて、oxytocin 投与によって黄体退行作用が現われ (Armstrong and Hansel, 1959; Hansel and Wagner, 1960; Hansel, 1964; Donaldson et al. 1965; Donaldson and Hansel, 1965, 1968), また囊腫様黄体の発生があることも認められている (Hansel, 1959; Hansel and Wagner, 1960)。また、最近では、卵巢静脈血中あるいは、黄体組織中の oxytocin の測定などにより、黄体由来の oxytocin の黄体退行作用が推測されている (Flint and Sheldrick, 1982) が、oxytocin の性周期発現における生理作用の詳細は、明らかにされていない。

本章では, anti- 11α -hydroxyprogesterone-hemisuccinate-bovine serum albumin-rabbit serum ならびに anti-oxytocin-rabbit serum を用いて, 免疫組織化学的に progesterone 産生細胞と oxytocin 産生細胞を検出し, 両者の関係を検討することによって, 内腔形成のある黄体の機能について調べた。

第2節 anti-11 α -hydroxyprogesterone-hemi-succinate-bovine serum albumin-rabbit serum を用いた免疫組織化学

数多くの蛋白質、ペプチド系ホルモンに対する抗ホルモン抗体が得られるようになり、この抗体を用いた radioimmunoassay あるいは、enzyme immunoassay による血中のホルモン濃度の測定と、免疫組織化学技術の発展に伴い、内分泌現象の機能形態学の分野は、急速な発展をとげてきている。つまり、免疫化学反応の特異性をもって、微量定量が可能となり、顕微鏡下で組織細胞内のホルモン抗原を検出することが可能となったわけである。しかしステロイドホルモンの分子量は、500以下と小さく、単独では抗原性をもたない為、ステロイドと蛋白との結合物に対して抗体が作られ、ステロイドそのものはハプテンとして働くことが明らかにされている (Erlanger et al. 1957; Abraham, 1969)。こうして作成された抗ステロイドホルモン抗体を用いた免疫組

組織化学による報告は少く, progesterone に関しては, おおむねブタ卵巢 (Mirecka; 1974, 1975), マウス 副腎皮質 (Kawaoi and Okano, 1977), ヒト胎盤 (上見, 1977; Kami et al. 1978) の報告があるにすぎない。

本検索は, anti-11 α -hydroxyprogesterone-hemisuccinate-bovine serum albumin-rabbit serum を用いた, ウシ黄体に対する免疫組織化学の可能性を検討し, 黄体細胞の progesterone 産生細胞の解析に検討を加える目的で行った。

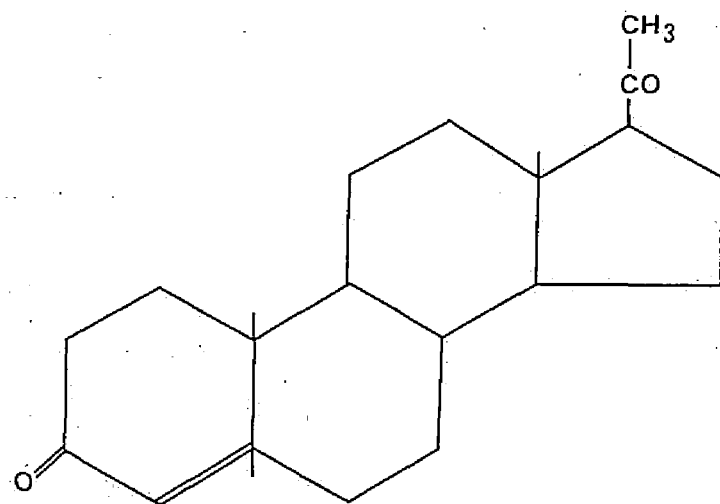
Ⅰ. 材料および方法

屠畜場においてホルスタイン種乳牛より, 子宮に肉眼的異常, あるいは胎芽, 胎仔の存在が認められない個体の卵巢から, 前章第2節の分類による開花期黄体 ($n=20$) を採取し, だいたい 5mm 四方角に細切して浸漬固定した。固定の検討として, 4% paraformaldehyde, 2% glutaraldehyde, ブラン液, 中性ホルマリン液を用いたが, 4% paraformaldehyde が最も良い成

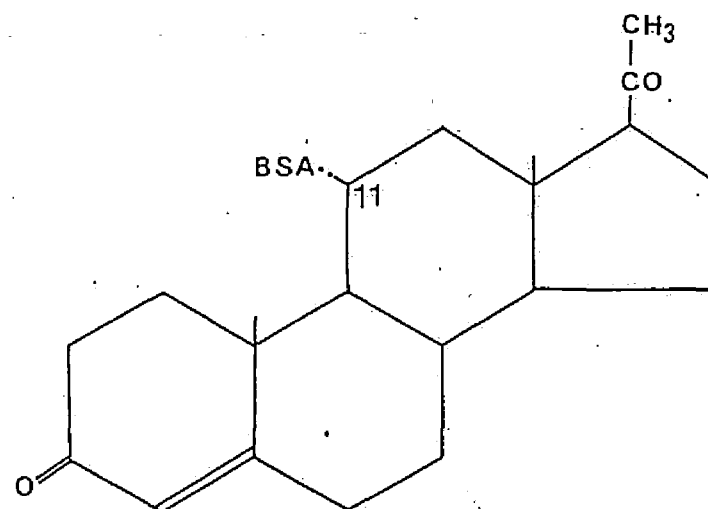
績であったので、以後の検索は、4% paraformaldehydeで行った。固定は、室温で6~7時間行い、続いてPBS (phosphate buffered saline, 0.01M, pH 7.2) で十分に洗浄の後、30% Sucrose 中に約12時間浸漬した。次に液体窒素で凍結し、5~10 μ のクリオスタット切片とした。作成した切片は、ゼラチン処理したスライドガラスに貼布し、約1分間室温放置の後、免疫組織化学的染色手技に移るまでPBS内に入れた。

一次抗体に用いた抗体 (anti-P) は、11 α -hydroxyprogesterone-hemisuccinate-bovine serum albumin (Fig. 5) を雄ウサギに免疫して作成されたものである。抗血清は、酪農学園大学中尾敏彦博士の好意により提供されたもので radio-immunoassay および enzyme immunoassay による他のステロイドとの交叉反応は、Table 9 に示す通りである。

酵素抗体法に用いた avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) 法の手技は、Hsu et al. (1981) の方法に従って、Vector 社 Vecstain ABC キット



progesterone



11 α -hydroxyprogesterone-hemisuccinate-
bovine serum albumin

Fig. 5. Schematic structures of progesterone and 11 α -hydroxyprogesterone-hemisuccinate-bovine serum albumin

Table 9. The cross reaction of antiserum to 11 α -hydroxyprogesterone-hemisuccinate-bovine serum albumin with various steroids determined by enzyme immunoassay and radioimmunoassay

Steroids	Cross reaction(%)	
	Enzyme immunoassay	Radioimmunoassay
Progesterone	100	100
Pregnenolone	21.63	19.52
5 α -pregnanedione	12.77	10.35
11-deoxycorticosterone	10.39	10.11
20 α -hydroxyprogesterone	3.12	4.50
17 α -hydroxyprogesterone	2.00	1.56
Androstenedione	0.56	0.53
Others	0.53	0.53

Nakao (1980)

(California)を用いて行った。

手順

1. 切片を非特異的反応の防止の為に、正常ヤギ血清で1時間反応

2. PBSで洗浄

3. anti-Pを12~18時間反応

4. PBSで洗浄

5. ビオチン化二次抗体を30分反応

6. PBSで洗浄

7. アビジン・ビオチン化ペルオキシダーゼ複合体を反応

8. PBSで洗浄

9. 0.02%過酸化水素水と0.02% 3,3'-ジアミロベンジジン塩酸塩(同仁化学, 熊本)を含む溶液(Trizma buffer, pH 7.4)で10~15分発色。

これらは、室温湿器内で行なわれ、3. の反応は、4℃以下で行なわれた。anti-Pの適正希釈濃度を知るために、20倍~5000倍まで、BSA 1%を含むPBSで希釈し、試験した。

なお、免疫組織化学レベルでの特異性の検定のために、以下のものを1次抗体の代替に使用した。

A. 1000倍希釈 anti-P に次の物質を 200 μ g/ml 加え、4°C, 24時間、反応させたもの。

1. progesterone (Merk, Darmstadt)
2. pregnenolone (Sigma, Saint Louis)
3. 17 α -hydroxyprogesterone (Sigma)
4. progesterone で反応させたのちに pregnenolone に反応させたもの。

5. progesterone で反応させたのちに 17 α -hydroxyprogesterone に反応させたもの。

6. pregnenolone で反応させたのちに 17 α -hydroxyprogesterone に反応させたもの。

B. 1000倍希釈 anti-P に bovine serum albumin を 0.1g/ml 加え、4°C, 24時間 incubate したもの。

C. 500倍希釈 normal rabbit serum

D. PBS

作成した標本を、通常の手段により脱水後、

バルサムにて封入して鏡検観察した。

II. 結 果

anti-P の特異性の検定の結果, progesterone で 24 時間反応させたものでは, ほとんど染色性を失い, pregnenolone では, おずかに影響を受け, 17 α -hydroxyprogesterone では, ほとんど影響を受けなかった (Table 10, Fig 6a-d)。また progesterone で反応させたあと, pregnenolone で反応させたものでは, 全く陽性反応を示さなかった (Table 10)。BSA を加え, 24 時間 incubate したものは, 全く影響を受けず, normal rabbit serum ならびに PBS では, 全く陰性であった。

陽性反応は, anti-P の希釈倍率が 20 倍から 2000 倍までに認められたが, 観察するのに適当な濃度は, 1000 倍であり, 以下の実験は, 全て 1000 倍に希釈した anti-P を用いて行なわれた。

一般所見

すべての黄体細胞が, anti-P に陽性反応を

Table 10. Absorbition test with progesterone, pregnenolone and 17 α -hydroxyprogesterone for the anti-11 α -hydroxyprogesterone-hemisuccinate-bovine serum albumin-rabbit serum

	progesterone	pregnenolone	17 α -hydroxy progesterone
progesterone	\pm	-	\pm
pregnenolone	-	+	+
17 α -hydroxy- progesterone	\pm	+	++

* grade of immunoreactivity; - completely absorbed
 \pm almost absorbed
 + slightly affected
 ++ not influenced

Fig. 6

Four serial sectiones stained with

a: anti-11 α -hydroxyprogesterone-hemisuccinate-bovine serum
albumin-rabbit serum (anti-P),

b: anti-P preincubated with 17 α -hydroxyprogesterone,

c: anti-P preincubated with pregnenolone,

d: anti-P preincubated with progesterone, respectively.

Small and large arrows indicate same cells, respectively.

Fixed with 4% paraformaldehyde. Cryostat section. x 950.

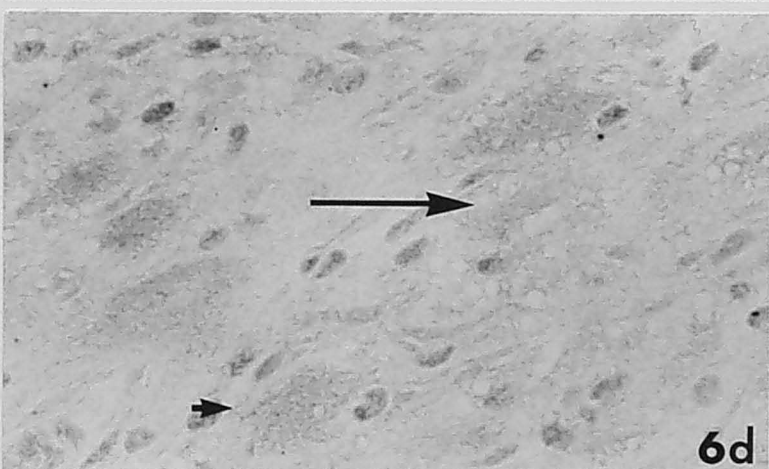
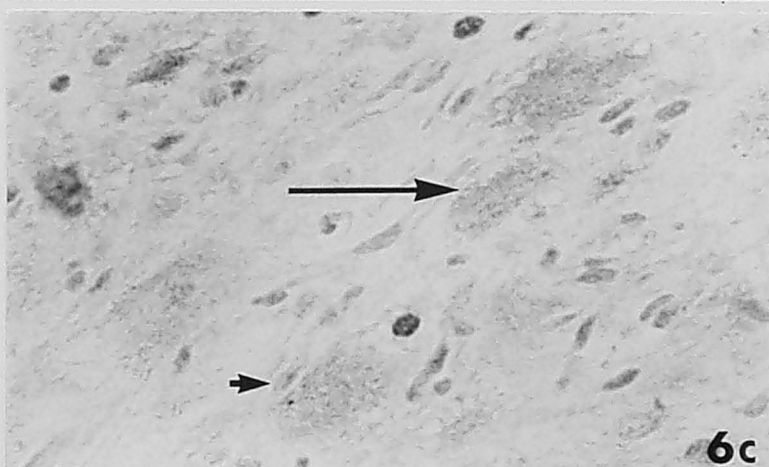
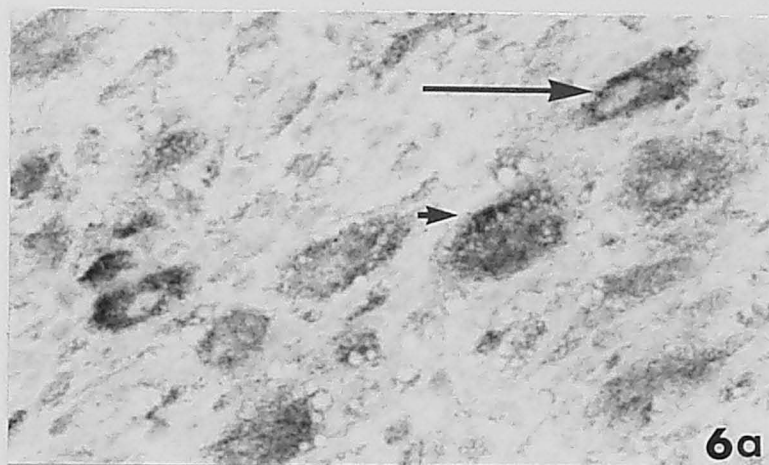


Fig. 7

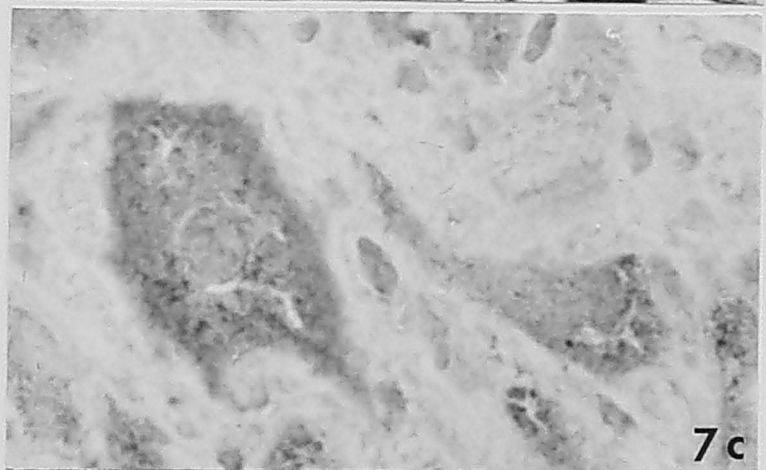
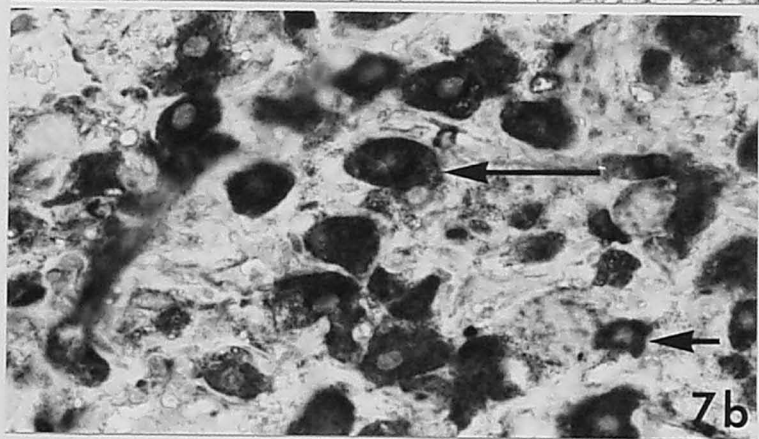
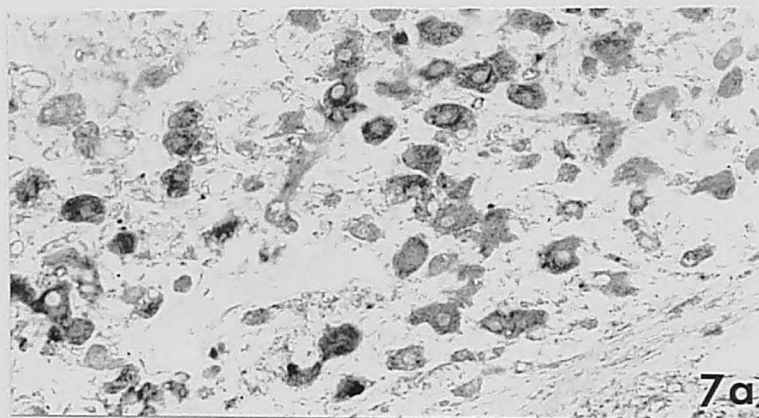
Luteal cells immunoreactive with anti-11 α -hydroxyprogesterone-hemisuccinate-bovine serum albumin-rabbit serum (anti-P) in the fully developed corpus luteum.

Both large (large arrow in b) and small (small arrow in b) luteal cells stained positively for anti-P in immunohistochemistry (a, b).

Some of large luteal cells showed slender cytoplasmic processes (c).

Fixed with 4% paraformaldehyde. Cryostat section.

a x 310, b x 660, c x 1180.



示した (Fig. 7a, b)。陽性反応は、細胞質全体にあたって均一に見られたが、強拡大で観察すると微細顆粒内容を呈し、核は、やや染まった。小型の黄体細胞は、大型黄体細胞の間に侵入しているように認められた。黄体細胞内に大小様々の脂肪滴が認められるものがあったが、脂肪滴の有無多少と、anti-Pに対する陽性反応に相関性は、認められなかった。大型の黄体細胞の形は不規則で、中には突起を出しているように見える細胞もあった (Fig. 7c)。

III. 考 察

ステロイドホルモンの分子量は 500 以下と小さく、それ自体では抗原性を持たないが、ステロイドと蛋白との結合物に対しては、抗体が作られ、ステロイドそのものは、ハプテンとして働くことが明らかにされ (Erlanger et al. 1957; Abraham, 1969), 免疫化学の基礎研究に大きな発展をとげてきた。しかし、感

度と精度を信頼するものにするためには、特異性の高い抗体を得る必要がある。一般に、ステロイドホルモンの抗体は、担体蛋白を結合する部位によって、その特異性が左右され、蛋白結合部から遠くにある側鎖ほど特異性が高く認識されることが明らかにされている (Gross, 1970)。本検索で用いた anti-P は、 11α -hydroxyprogesterone の C-11 の部位の水酸基を succinate に変換し、蛋白と結合させたもので、progesterone に対する特異性が高いとされているものである (Fig. 5, Table 9)。

本研究で用いた anti-P の特異性の検討で、progesterone でほぼ完全に吸収され (Fig. 6d)、pregnenolone では、おずかに影響を受け (Fig. 6c)、また progesterone に 24 時間反応させたあと、pregnenolone で反応させたものでは、陽性反応を全く示さなかったことより、本試験で用いた anti-P は、ほとんどが progesterone 様免疫活性物質と反応しているが、pregnenolone 様免疫活性物質ともおずかながら反応していることが示唆され

た。従って本法では、progesterins 産生細胞を検出していると考えられる。

濃淡の差は認められたが、全ての黄体細胞で陽性反応が認められたことは、大型の黄体細胞も小型の黄体細胞も progesterone 産生に関与しているという報告 (Koos, 1978; Koos and Hansel, 1981; Okuda et al. 1984) を裏付ける結果と思われる。Adashi and Hsueh (1981) は、ステロイド産生の調節に、"hypothalamo-hypophysial-gonadal axis" (視床下部-下垂体-性腺軸) の他に性腺そのものの調節機構があることを推測している。したがって、黄体細胞も、いわゆる内分泌機能の他に、パラクライン (傍分泌) 機能を有していることが推測される。傍分泌に関与する細胞は、突起を出すことを特長と考えられており (Fujita, 1981), 本研究において、陽性細胞の中に突起を出しているように見える細胞 (Fig. 7c) は、傍分泌に関与している細胞であることが示唆された。

本試験によつて、anti-P を用いて、ウシ黄

体の progestins 産生細胞の検出が可能であることが示され、また黄体細胞の傍分泌への関与が示唆された。

第3節 嚢腫様黄体の progesterone ならびに oxytocin 産生細胞に関する免疫組織化学的研究

Oxytocin 投与によつて黄体退行作用が現われ (Donaldson and Hansel, 1968), また嚢腫様黄体の発生が認められており (Hansel and Wagner, 1960), 最近では、ウシヤヒツジの黄体が progesterone だけでなく、oxytocin も産生分泌していることが明らかにされ (Flint and Sheldrick, 1982; Wathes and Swann, 1982), 中でも大型の黄体細胞が産生かつ分泌していることが報告されている (Rodgers et al. 1983; Guldenaar et al. 1984; Kruijff et al. 1985)。

本章第2節で、anti-11 α -hydroxyprogesterone-hemisuccinate-bovine serum albumin-rabbit serum (以下 anti-P) を用いて、免疫組織化学的にウシ黄体細胞の progestins 産生細胞を検出できることを明らかにした。本節では、嚢腫様黄体の黄体細胞機能を知る目的で、oxytocin 産生細胞と progesterone 産生細胞との関係を免疫組織化学的に検索した。

Ⅰ. 材料および方法

屠畜場において、ホルスタイン種乳牛より子宮に肉眼的異常あるいは、胎芽、胎仔の存在が認められない個体の卵巣から第2章第2節で述べた分類による開花期黄体を採取し、黄体の長軸に添って割を入れ、内腔を有する黄体（内径の大きさが1cm以上のもの、内径 = $\sqrt{\text{長径} \times \text{短径}}$ ）と、内腔を有さない黄体の各群に分類した。黄体をただちに5mm四方角に細切して、4% paraformaldehyde 液で室温、6~7時間、浸漬固定した。そのうちの一部は、通常の手段で脱水、透徹後、paraffinに包埋し、ミクロトームで3μmに薄切した。残りは、本章第2節で述べた手順で、5~10μmのクリオスタット切片とした。paraffin切片は、通常の手段により、脱パラフィンを行い、oxytocinの免疫組織化学に用い、クリオスタット切片は、本章第2節に述べた手順で、progestins ならびに oxytocin について免疫組織化学を行った。oxytocinの抗血清 (anti-oxy) は、抗-

oxytocin - 家兎血清 (I 481/002, ucb bioproducts, Brussels) を使用した。この抗血清は, mesotocin, isotocin ならびに vasotocin との交叉反応が認められているが, oxytocin には, 極めて特異的なものである。

anti-p の希釈濃度は, 本章第2節に述べた通りで, anti-oxy は, 500 倍から 2000 倍に希釈して試験したところ, 全希釈濃度で陽性反応が認められたが, 1000 倍で最も観察に適していたので以下の試験は, 1000 倍で行った。免疫組織化学の手法は, 本章第2節に述べた通りである。

II. 結 果

内腔の有無にかかわらず, 全ての黄体細胞が, anti-p に対して陽性反応を示し, 大型の黄体細胞の中には, 突起を出しているものも観察された。

また, anti-oxy に対しては, 内腔の有無にかかわらず, 大型小型の両黄体細胞で陽性反

応が認められた (Fig. 8 ab, Fig. 9 b 矢印)。
また、クリオスタットで作成した隣接切片に
関し、anti-P と anti-oxg で反応させたところ、
同一細胞 (Fig. 9 a, b. 矢印) で、両抗体に対
する陽性反応が見られた。

Ⅲ. 考 察

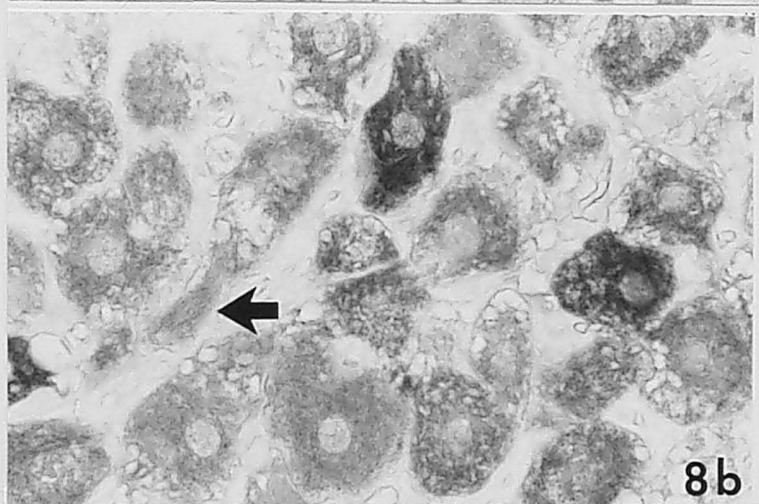
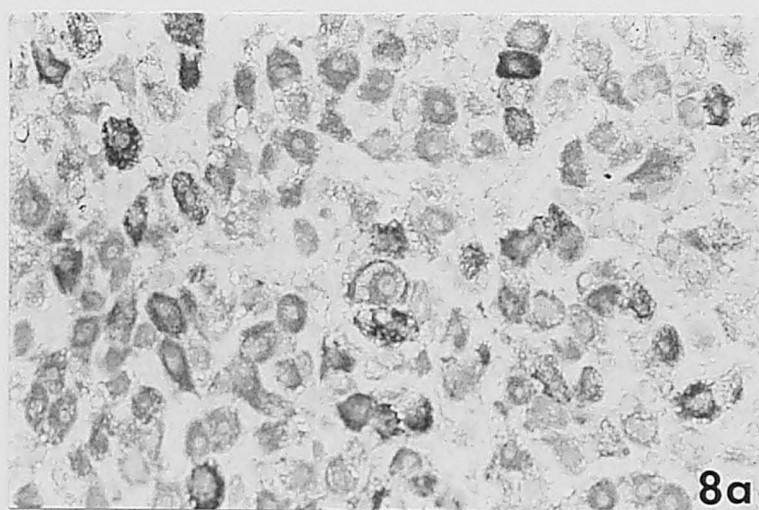
内腔を有する黄体細胞の機能を検討する目
的で anti-P と anti-oxg を用いて免疫組織化
学的な検索を行ったところ、内腔の有無にか
かわらず、全ての黄体細胞が、anti-P に対し
て陽性反応を示し、anti-oxg に対しても、内
腔の有無にかかわらず、多くの黄体細胞が陽
性反応を示した (Fig. 8 ab, Fig. 9 b)。このこ
とと、第2章第3節において、形態によって
分類した黄体細胞のⅠ型とⅡ型を加えた割合
について、内腔の有無によって差が認められ
なかったこと (Table 6) より、内腔の形成は
黄体細胞の progesterone ならびに oxytocin 産生機能
に影響を与えないことが示唆された。

Fig. 8

Section of fully developed corpus luteum showing large luteal cells containing immunoreactive cells show various shapes and some cells elongated cytoplasm (arrow in b).

Fixed with 4% paraformaldehyde. Paraffin section.

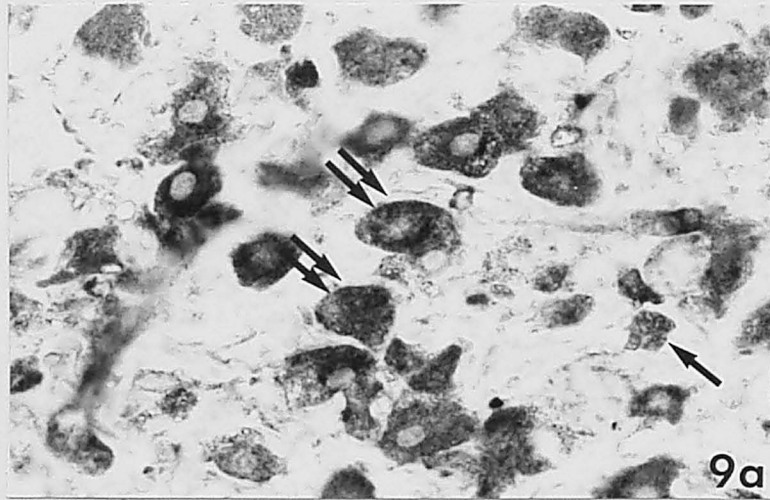
a x 310, b x 950



群と同じで、大きな内腔の出現でも妊娠は成立し維持されることが明らかとなった (Fig. 10)。

嚢腫様黄体と受胎との関係について、McEntee (1958) は、屠場材料において不妊牛では直径 7mm 以上の中心腔を形成する黄体が比較的多く、妊娠牛には全く見られないことから、このような黄体は不妊の原因として推測している。また嚢腫様黄体の形成が見られたラシでは黄体組織中 progesterone 含量が低く、正常胚芽がわずかしか見られないことより、このような黄体を有するものでは、胚芽の死滅が起こり得ることが示唆されている (Staples and Hansel, 1961; Staples et al, 1961)。また倉ら (1975) は、不妊牛の黄体期における子宮分泌液中の糖質濃度を測定して、嚢腫様黄体形成例では低値を示すものが多いか、正常値の範囲にあるものもあって、個体差が著しいことを示している。

一方、Malven et al. (1963) は、妊娠 40~



本研究では、大型の黄体細胞だけでなく、小型の黄体細胞も anti-oxg に対して陽性反応を示し (Fig. 9b), 大型黄体細胞のみが陽性反応を示したとする Guldenaar et al. (1984), Kruij et al. (1985) らの報告と異なっている。その理由として本試験では、凍結切片を用い、他の報告では、paraffin 切片を用いていることが考えられる。一般的に、凍結切片は、paraffin 切片に比べて抗原性の保持が良いと言われており、paraffin 切片では抗原力が弱まって検出できなかったものと考えられる。

Alila and Hansel (1984) は、卵胞膜内茨膜細胞と顆粒膜細胞と抗血清を作成し、ウシ黄体細胞の由来を探索し、初期黄体では大型細胞は、顆粒膜由来で、小型細胞は内茨膜由来であるとし、小型黄体細胞は大型黄体細胞に成長すると述べ、また、顆粒膜由来の黄体細胞は、妊娠初期に消失し、内茨膜由来の細胞は妊娠全期間、存在すると述べている。妊娠黄体では、anti-oxg に対する陽性反応が全く認

められない (Guldenaar et al. 1984) ことより、陽性反応を示しているのは、顆粒膜細胞由来のもので、本試験で陽性反応を示した小型の黄体細胞も、顆粒膜細胞由来のものであると考えられる。

連続切片で、anti-P と anti-oxyl を用いて、検索したところ、同一黄体細胞に両抗体に対して陽性反応が認められたことより、同一の黄体細胞内で progestins も oxytocin も産生されていることが明らかになった。Kruip et al. (1985) は、ウシの卵胞顆粒膜層細胞でも oxytocin が産生されていることを示している。卵巣で産生分泌される oxytocin の性周期発現のための生理作用は、まだ明らかにされていないが、oxytocin に対する免疫を行うことによって、性周期の延長が観察されたことにより、黄体退行作用への役割が推測されている (Sheldrick et al. 1980; Flint and Sheldrick, 1983; Schams et al. 1983)。こうした oxytocin の卵巣内での役割に関して、Guldenaar et al. (1984) は、卵巣自身

内の steroid 調節を推測している。本試験において、大型黄体細胞に突起を出しているように見えるものが観察されたが、Fujita (1981) は、傍分泌に関与する細胞は、突起を出すのを特長とすると述べており、これらの黄体細胞が傍分泌に関与し、"hypothalamo - hypophysial - gonadal - axis" (視床下部 - 下垂体 - 性腺軸) の他の、卵巣内その他のものの steroid 産生の調節機構に関与していることが示唆された。

第4節 小 括

本章では、まず anti- 11α -hydroxyprogesterone-hemisuccinate-bovine serum albumin-rabbit serum (anti-P) を用いて、免疫組織化学的に progesterone 産生細胞を検出する可能性を検討し、ついで、内腔形成のある黄体と、ない黄体の黄体細胞機能を検討する目的で、anti-oxytocin-rabbit serum (anti-oxy) ならびに anti-P を用いて、免疫組織化学的に oxytocin 産生細胞と progesterone 産生細胞との関係を調べた。得られた結果は、つぎの通りである。

1. anti-P の特異性の検討で、progesterone の他に、progesterone の代謝系前後の pregnenolone ならびに 17α -hydroxyprogesterone に関して吸収試験を行ったところ、progesterone でほぼ完全に吸収され、pregnenolone では、おずかに影響を受けたにすぎず、 17α -hydroxyprogesterone では、ほとんど影響を受けなかった。また progesterone に24時間反応させたあと、pregnenolone で反応さ

せた anti-P では、陽性反応を全く示さなかったことより、本章で用いた anti-P は、ほとんど progesterone 様免疫活性物質と反応しているが、pregnenolone 様免疫活性物質とも、おびかに反応していることが示され、本法では progestins 産生細胞を検出できることが明らかとなった。

2. anti-P を用いて免疫組織化学を行、ところ、大型黄体細胞、小型黄体細胞ともに陽性反応を示し、両細胞ともに progestins を産生していることが明らかとなった。また、大型黄体細胞の中には、突起を出しているように見える細胞があり、黄体細胞がパウクウイン（傍分泌）機能を有していることが示唆された。

3. 内腔形成の有無にかかわらず、全ての黄体細胞が、anti-P に対して陽性反応を示し、anti-oxg に対しては、内腔の有無にかかわらず、クリオスタット切片では、大型および小型の黄体細胞が陽性反応を示した。このことより、内腔形成は、黄体細胞の progestins ならび

に oxytocin 産生機能に影響を与えないことが示唆された。

4. 連続切片で anti-p と anti-oxy を用いて検索したところ、同一黄体細胞で両方のもつに対する陽性反応が認められたことより、同一の黄体細胞内で progestins も oxytocin も産生されていることが明らかとなった。

第 4 章

嚢腫様黄体が性周期と受胎に及ぼす影響

第1節 緒言

嚢腫様黄体を有するウシの性周期に関しては、Dawson (1959) が、性周期の延長を報告しているが、性周期に影響はないという報告もある (本間と須川, 1960; Wagner, 1962)。しかし、いずれの報告も直腸検査による検査結果であり、客観性において充分であるとは言えない。また、嚢腫様黄体が、他受胎牛 (リピードブリーダー) の原因になっているかを検討する為には、内腔出現の再現性が問題となる。しかし、現状で、2周期以上に渡って継続して観察を行い、内腔の再現性について述べた報告は無く、嚢腫様黄体がリピードブリーダーの原因になっているかどうかは、明らかにされていない。

本論文第2章ならびに第3章において、内腔形成の有無によって形態学的あるいは、内

分泌学的に、両者間にほとんど差が認められなかったことを報告した。本章では、黄体の中心に出現する内腔を客観的に観察し、内腔形成が性周期あるいは、受胎に影響するかどうかを検討した。

第2節 嚢腫様黄体が性周期に及ぼす影響
と次周期における再現性

嚢腫様黄体を実際の臨床の現場で診断することの難しさは、直腸検査と剖検の所見を比較した報告で明らかにされている (Hornig, 1978; Grunert, 1979)。しかし、生体に関する嚢腫様黄体に関する報告は、すべて直腸検査によるものであったために、客観性に乏しい。

これらの中心腔の発生原因として、LH不足 (McEntee, 1958; Greenstein, 1960) による黄体形成不全、あるいは、排卵後、排卵部位の早期閉鎖、また、オキシトリンの分泌異常 (Staples et al. 1961) などが挙げられているが、黄体の内腔形成が特発的なものであり、次の性周期で再現性が無いのであれば、不妊症としての重要性は無いことになる。

本節では、嚢腫様黄体の病的意義を知る目的で、内腔形成のある黄体をもちろしの性周期の長さ、ならびにその再現性を検討した。

I. 材料および方法

試験に用いたウシは、専ら畜産大学附属農場で飼養されているホルスタイン種乳牛（1～13才）で、飼養形態は、第2章第2節に述べた通りである。なお、未経産牛は、15ヶ月齢350kg以上のもの、経産牛は、分娩後、生理的空胎期を経過したもののみを試験の対象とした。

乗駕行動によって発情を確認したのべ78頭にAIを行い、翌日に直腸検査によって排卵確認を行った。AI後5日目、及び10日目に超音波断層診断装置を用いて黄体を走査した。装置ならびに使用手順は、第2章第2節で述べた通りである。走査の結果、黄体の中心に内腔形成が認められたウシについては、引き続き、16日目、21日目、その後2日おきに内腔の消失まで観察を続けた。AI後、発情の回復したウシの一部については、次周期も引き続き観察を行い、内腔の再現性を観察した。なお、内腔の大きさは、第2章第2節で述べ

た方法で求め、その大きさによつて 1 ~ 6 mm, 7 ~ 9 mm, 10 ~ 14 mm, 20 mm 以上の各群に分けて検討した。

II. 結 果

AI を行つたウシ 78 頭中 33 頭に発情が回復した。そのうち、黄体の中に内腔形成のあったウシは 12 頭、内腔を有していなかったウシは、21 頭であった (Table 11)。AI から発情が回復するまでの日数は、内腔形成のあった牛群で、平均 28.8 日、内腔が出現しなかった牛群では、平均 26.8 日で両群間に有意な差は認められなかった (Table 11, $P > 0.05$)。また AI から発情が回復するまでの日数を 30 日以内と 30 日以後に分けて内腔の有無によつて比較したところ、内腔形成のあった群で 22.0 日, 42.5 日、内腔を有していない群で 21.1 日, 39.3 日と、それぞれ両群間に有意差は認められなかった。これらのうち AI 後 30 日以後に発情が回復したウシは、内腔形成のあった牛群で

は、12頭中4頭、内腔を有していない牛群では21頭中7頭で、両群ともに33.3%で差はなかった (Table 11)。

発情が回復した33頭のうちのうち、12頭について、2周期目あるいは、3周期目と継続して観察を繰り返して、黄体中心への内腔出現の再現性を調べたところ、2周期目も観察を繰り返した7例中、内腔が1周期のみ出現したものは4例、2周期とも出現したものは1例、一度も出現しなかったものは2例あった。また、3周期にわたり観察した5例中、内腔が1周期のみに観察されたものの2例、2周期観察されたものの1例、残りの2例では、内腔は観察されなかった (Table 12)。また、継続して2周期以上観察を行った12例中、2周期にわたり連続して黄体の中心に内腔が観察されたのは、2例のみで、うち1例は、次の周期では観察は行われず、残りの1例は、次周期では、内腔は観察されなかった (Table 12)。

Table 12. Reappearance of cavity* in the corpus luteum

	Cow no.	Observation		
		1st	2nd	3rd
Observed 2 times	477	-	-	
	139	-	-	
	16	+	-	
	24	+	-	
	289	+	+	
	140	++++	-	
	204	++++	-	
Observed 3 times	193	-	-	-
	488	-	-	-
	321	-	++++	-
	108	++	++++	-
	397	+++	-	-

* Maximum size of cavity in CL (mm):

0 (-), 1-6 (\pm), 7-9 (+), 10-14 (++) , 15-19 (+++), ≥ 20 (++++).

Table 11. The period that cows returned to estrus after artificial insemination

		Return to Estrus		Total
		within day 30	more than day 30	
CL with cavity	No.	8 (66.7%)	4 (33.3%) ^a	12
	mean days	22.0	42.5	28.8 ^b
CL without cavity	No.	14 (66.7%)	7 (33.3%) ^a	21
	mean days	21.1	39.3	26.8 ^b

^{a, b} There was no significant difference.

Ⅲ、考 察

本研究では、超音波断層診断装置を用いて生体内での黄体内腔の存在を客観的に観察し、内腔形成のあったウシの性周期、ならびに内腔形成のあったウシで内腔が次周期でも再び出現するのかどうかを検討した。

AI後、観察を行った78頭のウシのうち、発情が回復したものは、33頭あり、黄体の中心に内腔を認めたウシは、そのうち12頭、認められなかったウシは、21頭であった。AIから発情回復までの日数は、内腔の出現した牛群で平均28.8日、内腔形成のなかった牛群で26.8日で、両群間に有意差は認められず (Table 11) また、早期胚芽死例と思われるAI後30日以後に発情が回復したものの割合は、内腔形成の有無にかかわらず33.3%で、本観察からは、嚢腫様黄体と早期胚芽死との関連は、全く見出されなかった。不受胎の直接的な原因としては、主として受精障害と胚芽死が挙げられるが、後者が重要視されている (Hansel, 1981,

1985)。

他受胎牛(リピードブリーダ)の中から、
嚢腫様黄体と診断したウシを選び、黄体内腔
液を吸引あるいは圧迫によって排除し、HCG
を内腔内に注入するなどの処置によって受胎
に成功したという報告(金田と松田, 1970;
金田ら, 1980)は、内腔形成を黄体形成不全と
みなし、黄体機能不全症として早期胚芽の死
滅との関係を推論しており、本観察とは全く
逆の結果と言える。

第2章第4節の結果では、内腔形成のあつ
た黄体組織中 progesterone 濃度は、内腔のない黄
体に比べ有意に低かったが、血清中 progesterone
濃度には、両群間に有意差は認められなかつ
た。黄体組織中 progesterone 濃度が低かった理由
は、不明であるが、血清中 progesterone に差が認
められなかったことより、内腔形成のある黄
体でも妊娠維持するに十分な progesterone を分泌
しており、不妊症の原因には、ならないと考
えられる。これらのことより、嚢腫様黄体に

対する治療は、不必要であり、また受精卵移植の際、受精卵の黄体に内腔形成が認められても、受精卵の能力としては全く問題ないと考ええる。

え同期目、あるいは同期目に関しても黄体内腔の再出現について観察を行ったところ、再現性は認められず、内腔は、偶発的に出現するものであることが明らかとなり、もし何らかの不妊的要因があるとしても、リコードブリーダのように再現性のあるものではないことが明らかとなった。

オ3節 嚢腫様黄体が受胎に及ぼす影響

屠殺後のウシ卵巢の検索で、妊娠黄体に内腔が極めて稀にしか見出されないこと (McEntee, 1958; Dawson, 1959), 見出されても変性胚芽が確認されたこと (Borowski, 1972), あるいは嚢腫様黄体組織中の progesterone 含量が少いこと (Staples et al, 1961; Hansel, 1964; Donaldson and Hansel, 1968; Donaldson and Takken, 1968; Hoffmann, 1969) などが、嚢腫様黄体を不妊症の原因として見る理由である。一方, Malven et al, (1963) や Morrow et al, (1966) は、直腸検査によって妊娠黄体に内腔を有するものがあり妊娠2~4ヶ月の間に消失すると述べている。

本章オ2節で、黄体に内腔が観察されたウシの性周期は正常で、また内腔の出現に再現性がなくリポイドブリーダーの原因としては考えられないことを明らかにした。本研究は、内腔の出現が受胎率に影響するのかを調べる目的で行われた。

I. 材料および方法

実験に用いたウシは、帯広畜産大学附属農場で飼養されているホルスタイン種雌ウシ（1〜3才）で、飼養形態は、第2章第2節に述べた通りである。なお、未経産牛は、15ヶ月齢 350 kg 以上のもの、経産牛は、分娩後生理的空胎期を経過したもののみを実験の対象とした。

乗駕行動によって発情を確認し、直腸検査の結果、授精適期と認めたのべ78頭にAIを行い、翌日に直腸検査によって排卵確認を行った。AI後5日目及び10日目に超音波断層診断装置を用いて、黄体を走査した。超音波断層診断装置、ならびにその使用手順については、第2章第2節に述べた通りである。その結果、黄体に内腔の観察されたウシについては、引き続き16日目、21日目、その後2日おきに内腔の消失まで観察をつづけた。内腔の大きさは、第2章第2節で述べた方法で求め、その大きさによって1〜6 mm, 7〜9 mm,

10 ~ 14 mm, 15 ~ 19 mm, 20 mm 以上の各群に分類した。

受胎率は、AI 後 63 日目に直腸検査により受胎を確認し、内腔を有するものを上記の各群別ならびに内腔を有しない群について求めた。群間の平均値の差の比較を t 検定で行った。

II 結 果

本観察における総受胎率は、57.7% ($45/78$) であった。また、内腔を有する黄体の群 (58.6%) と内腔を有しない黄体の群 (52.1%) との間に有意な差は認められなかった (Table 13, $P > 0.05$, t -test)。また、内腔の大きさが 15 mm 以上の大きな内腔を有する群の受胎率は 52.1% で、内腔の出現しなかった群と同じであった。

内腔の大きさは排卵後 16 日目までにピークをむかえ、それ以後徐々に縮小し、やがて消失することは、第 2 章第 2 節ですでに述べた

。黄体組織は、排卵後5日目観察時には不明瞭であったが、10日目には卵巣実質との境界が明瞭となった。排卵後16日目以後、内腔の縮小に伴い、黄体壁の厚さが増すのが明瞭に確認でき、妊娠の確認は30日目頃に約10mmのFetusを子宮内に確認することにより可能であった(Fig. 10)。



Ⅱ. 考 察

一定の飼養管理下にある78頭のホルスタイン種雌ウシにAIを行い、超音波断層診断装置を用いて継続的に黄体を走査して、内腔を有する牛群と、内腔を有していない牛群について受胎率を比較した。受胎率は、内腔を有している群では58.6%、内腔を有していない群では57.1%で、両群間には有意差は認められなかった(Table 13, $P > 0.05$) ことあり、内腔の出現が受胎に及ぼす影響は、全くないことが示唆された。また15mm以上の内腔を有する群でも受胎率は57.1%と内腔の出現しなかった

Table 13. Pregnancy rate of cows with and without cavity

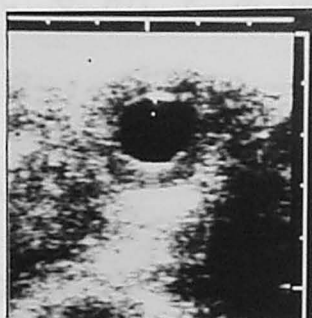
	Maximum size of cavity (mm)	No.	No. of pregnancy	Pregnancy rate (%)
CL with cavity	1-6	5	2	58.6 ^a 57.1 ^a (≥15 mm)
	7-9	5	3	
	10-14	5	4	
	15-19	7	5	
	≥20	7	3	
CL without cavity		49	28	57.1 ^a
Total		78	45	57.7

a: There was no significant difference.

Fig. 10. Ultrasound images of CL with cavity from its appearance to disappearance. Day 5: Cavity was seen at the center as an echo-free space. It was difficult to distinguish between CL and other ovarian tissues. Day 10: Cavity reached its maximum size.  CL was clearly distinguishable from other ovarian tissues.  Day 16: Cavity started to decrease in size. Day 21, 24, 30, 36: The cavity size decreased gradually. Fetus was seen in the uterus on Day 30. Day 48: Cavity disappeared.



Day 5: $\phi = 14$ mm



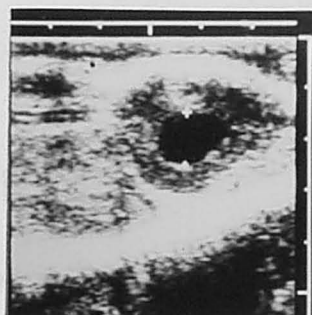
Day 21: $\phi = 15$ mm



Day 30: Uterus



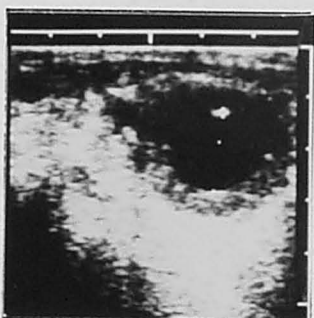
Day 10: $\phi = 19$ mm



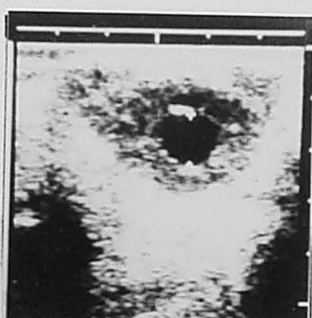
Day 24: $\phi = 13$ mm



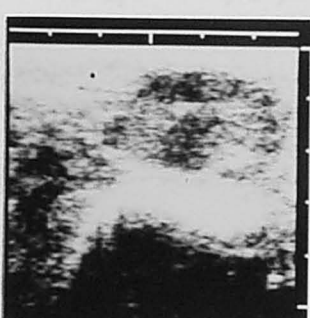
Day 36: $\phi = 8$ mm



Day 16: $\phi = 17$ mm



Day 30: $\phi = 10$ mm



Day 48: $\phi = 0$ mm

50日に直腸検査によって嚢腫様黄体と診断されたものが、妊娠80〜120日には、正常な黄体になっていたと報告し、Morrow et al. (1966) は、妊娠牛190頭のうち黄体が一時的に嚢腫様黄体の形態を呈していたものが18%に見られ、これらの黄体の中心腔に貯留する液体は、妊娠2〜4ヶ月のうちに自然に吸収され消失すると述べており、同論文では、嚢腫様黄体に対する治療処置の必要性、あるいはその効果について疑問を投げかけている。それに対し、低受胎牛から嚢腫様黄体の形成を認めたウシに、黄体内腔液の排除、HCGの注入などの処置を行い受胎性に効果があったという報告もある（金田、松田 1970；金田ら 1980）。本研究では、内腔形成の有無によって受胎率に差がなく、内腔の出現が受胎に及ぼす影響は無いことが強く示唆された為、临床上これらの黄体に治療処置を行う必要はないと考える。

内腔の発生に関しては、排卵後、卵腔液の

漏出が不十分であるうちに排卵部位の閉鎖が起ったとする説 (Krupski, 1917, Hammond, 1924), LH 分泌不足による黄体形成不全であるという説 (McEntee, 1958; Greenstein, 1960; Grunert 1969) あるいは卵巣周囲の炎症が影響をしているという説 (Grunert, 1969) など諸説がある。一方では Anti-LH-Serum の投与によって黄体の成長を抑制できたが、内腔の出現には影響しなかった (Snook et al. 1969)。本研究では発生要因に関する検索は行っていないが、第2章第3、4節ならびに本章において内腔の存在が黄体の生理機能に何影響を及ぼしていないことが強く示唆されたため、Krupski (1917) あるいは Hammond (1927) らの述べるように、排卵部位の急速な閉鎖が起って卵胞液が十分排出できなかったものと考えられる。Grunert (1969) は、嚢腫様黄体の内腔液、血清、乳汁、卵胞嚢腫液の電気泳動像を比較して嚢腫様黄体液と血清成分は非常に似ていることを示しており、内腔液は卵胞液だけ

ではなく、若い黄体で急速に形成される血管系からの分泌液であろう。

未経産牛で AI 後、超音波断層診断装置を用いて受胎産物 (conceptus) を認めるのは、AI 後 12 ~ 14 日目で、胚芽 (embryo) は、26 ~ 29 日目である (Pierson and Ginther, 1984)。本研究では、経産牛が多かったが、30 日目で子宮を走査したところ容易に受胎産物が確認できた。また胚仔 (Fetus) を 10 mm 前後で確認できた (Fig 10)。本研究では、黄体内腔の観察のために超音波断層診断装置を繰り返し使ったが、総受胎率は、57.7% (45/78) であり、これは本研究に用いた農場の例年の初回授精受胎率 (約 60%) とほぼ同じであり、超音波断層診断装置の使用が受胎に及ぼす影響はないことが明らかとなった。

第4節 小 括

嚢腫様黄体が、低受胎率（リポードブリーダ）の原因であるかを探る目的で超音波断層診断装置を用いて一定の飼養管理下にあるホルスタインに種乳牛78頭についてまず内腔形成の再現性を観察し、ついで内腔形成が性同期ならびに受胎に及ぼす影響について検討した。得られた結果はつぎの通りである。

1. 人工授精（AI）の後、2同期、あるいは3同期目に関しても継続して黄体内腔形成の再現性について12頭のウシを観察したところ2同期連続して内腔形成が認められたウシは12頭中2頭だけで、3同期にわたり内腔形成の観察された例はなかったことより、内腔は偶発的に出現するものであることが明らかとなり、リポードブリーダの原因になっていないことが強く示唆された。

2. AI から発情回復までの日数を内腔形成のあった牛群と内腔形成のない牛群とで比

較したところ、両群間に有意差は認められず、また AI 後 30 日以後に発情が回復したものの割合は、両群とも 33.3% で両群間で全く差は認められなかったことより、囊腫様黄体と早期胚芽の死との関係は否定された。

3. AI 後、内腔形成のあった牛群となかった牛群について受胎率を比較したところ、内腔形成のあった群で 58.6%、なかった群で 57.1% で、両群間に有意差は認められず、内腔形成が受胎に及ぼす影響は、全くないことが明らかとなった。また 15mm 以上の大きな内腔を有する牛群でも受胎率は 57.1% と内腔形成のなかった群と全く同じで、大きな内腔の形成でも妊娠は成立し、維持されることが明らかとなった。

ウシにおいて排卵後形成される黄体の中心に内腔形成がある場合、cystic corpus luteum (嚢腫様黄体) と呼び、早期胚芽死の原因となり得ると考えられている。しかし、現在まで、臨床的に黄体内の内腔を、客観的に診断することが極めて困難であった為に、黄体内腔の形成と不受胎の関係には、未だに不明な点が多く残されている。

そこで本研究では、ウシ黄体の内腔形成が黄体機能へ及ぼす影響ならびに不受胎との関係を検討する目的で、屠畜場から得た材料ならびに生体材料について、まず、形態学的、内分泌学的に探索し、ついで免疫組織化学的に黄体細胞の progesterone と oxytocin 産生細胞についても、内腔形成の有無によ、て検討した。さらに超音波断層診断装置を用いて、内腔形成が受胎に及ぼす影響について直接的に検討した。

ウシにおいて排卵後形成される黄体の中心に内腔形成がある場合、cystic corpus luteum (嚢腫様黄体) と呼び、早期胚芽死の原因となり得ると考えられている。しかし、現在まで、臨床的に黄体内の内腔を、客観的に診断することが極めて困難であった為に、黄体内腔の形成と不受胎の関係には、未だに不明な点が多く残されている。

そこで本研究では、ウシ黄体の内腔形成が黄体機能へ及ぼす影響ならびに不受胎との関係を検討する目的で、屠畜場から得た材料ならびに生体材料について、まず、形態学的、内分泌学的に探索し、ついで免疫組織化学的に黄体細胞の progesterone と oxytocin 産生細胞についても、内腔形成の有無によって検討した。さらに超音波断層診断装置を用いて、内腔形成が受胎に及ぼす影響について直接的に検討した。

得られた結果の概要はつぎの通りである。

Ⅰ. 嚢腫様黄体に関する形態学的ならびに 内分泌学的検索

1. 屠畜場から得た材料において内腔形成あったりし黄体の発生率は、発展期 42.1% (80/190), 開花期 33.7% (126/374), 退行期 11.1% (7/63) であり、排卵直後の黄体には、半数近くに内腔形成が見られるが、徐々に消失していくことが示され、また、全体材料について超音波断層診断装置を用いて、黄体内腔を継続的に観察したところ、内腔は、排卵後10日目頃に最大となり、大部分が次発情期には消失することが明らかとなった。また、妊娠黄体にも内径 1.9 cm のものが観察され、内腔を形成する黄体でも妊娠維持する例があることが示された。

2. Midcycle follicle ($\phi \geq 1.0$ cm) の出現と、内腔形成のあった黄体との関係は、発展期黄体

では、内腔形成のあった群に卵胞出現が有意に多かったが、開花期黄体では内腔形成の有無によって卵胞出現率に有意差は認められなかった。midcycle follicle の出現は、黄体開花期には、90%以上にも及び、黄体内腔の形成あるいは、不妊症の原因とは無関係であると考ええる。

3. 黄体細胞を形態によってⅠ～Ⅴの5型に分類し、開花期黄体に関して、内腔形成の有無によって各型の細胞の出現率を検討したところ、内腔形成のある黄体では、Ⅰ型細胞は有意に多く、Ⅱ型細胞は有意に少なかった。しかし、Ⅰ型とⅡ型を加えた割合や、他型の黄体細胞の出現率には、両群間に差がないことより、内腔形成の有無による黄体間に、機能の差はないと考える。

4. 黄体組織中 progesterone 濃度を、開花期黄体について内腔形成の有無によって検討したところ、内腔の大きさににかかわらず内腔のあった黄体のほうが有意に低く、progesterone 産生

機能の低下が示唆された。しかし、AI後10日目における血清中 progesterone 濃度を、黄体に内腔形成のあった牛群と、内腔を有していない牛群間で比較したところ、両群間に有意な差は認められず、progesterone 分泌機能に関しては、差がないことが示唆された。

II. 嚢腫様黄体の黄体細胞中 progesterone ならびに oxytocin に関する免疫組織化学的研究

1. anti- 11α -hydroxyprogesterone-hemi-succinate-bovine serum albumin (anti-P) の免疫組織化学における、特異性の検討で progesterone の他に progesterone の代謝系前後の pregnenolone ならびに 17α -hydroxyprogesterone に関して吸収試験を行ったところ、progesterone では完全に吸収され、pregnenolone では、明らかに影響を受けたにすぎず、 17α -hydroxyprogesterone ではほとんど影響を受けなかった。また progesterone に24時間反応させたあと、pregne-

lone で反応させた anti-P では、陽性反応を全く示さなかったことより、本章で用いた anti-P は、ほとんど progesterone 様免疫活性物質と反応しているが pregnenolone 様免疫活性物質とも反応していることが示され、本法では、progestins 産生細胞を模出していることが明らかとなった。

2. anti-P を用いて免疫組織化学を行ったところ、大型黄体細胞、小型黄体細胞ともに陽性反応を示し、両細胞ともに progestins を産生していることが明らかとなった。また、大型黄体細胞の中には、突起を出しているように見える細胞があり、黄体細胞がパラクライン（傍分泌）機能を有していることが示唆された。

3. 内腔形成の有無にかかわらず全ての黄体細胞が、anti-P に対して陽性反応を示し、anti-Oxy に対しては、内腔の有無にかかわらず全ての大型黄体細胞と一部の小型黄体細胞が、陽性反応を示した。このことより、内腔

形成は、黄体細胞の progestins ならびに oxytocin 産生機能に影響を与えていないことが明らかとなった。

4. 連続切片で anti-P と anti-oxy を用いて検索したところ、同一黄体細胞で両抗体に対する陽性反応が認められたことより、同一の黄体細胞内で progestins も oxytocin も産生されていることが明らかとなった。

Ⅲ. 嚢腫様黄体が性周期と受胎に及ぼす影響

1. 人工授精 (AI) の後、2 周期、あるいは 3 周期に関しても超音波断層診断装置を用いて、継続して黄体内腔形成の再現性について観察したところ、2 周期連続して内腔形成が認められたウシは、12 頭中 2 頭だけで 3 周期にあたり内腔形成の観察された例はなか。たことより、内腔は偶発的に出現するものであることが明らかとなり、リポードブリーダー

の原因にならないことが強く示唆された。

2. AIから発情復帰までの日数を内腔形成のあった牛群と、内腔形成のない牛群とで比較したところ、両群間に有意差は認められず、また、AI後30日以後に発情が復帰したものの割合は、両群とも33.3%で両群間で全く差は認められなかったことより、囊腫様黄体と早期胚芽の死との関係は否定された。

3. AI後、内腔形成のあった牛群となかった牛群で受胎率を比較したところ、内腔形成のあった群で58.6%、なかった群で57.1%で、両群間に有意差は認められず、内腔形成が受胎に及ぼす影響は、全くないことが明らかとなった。また、15mm以上の大きな内腔を有する牛群でも受胎率は57.1%と、内腔形成のなかった群と全く同じで、大きな内腔の形成でも妊娠は成立し、維持されることが明らかとなった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本論文作成の機会を賜り、たえず暖い御協力をいただいた京都大学教授入谷明博士に深甚の謝意を表す。また、本研究の遂行上たえず有意義な助言と御教示をいただいた帯広畜産大学教授佐藤邦宪博士に深く感謝の意を表す。さらに実験の遂行上たえず有意義な助言と暖かい御協力をいただいた帯広畜産大学助教授山田純三博士、帯広畜産大学助手北村延夫氏ならびに帯広畜産大学家畜臨床繁殖学研究室の謝氏に対して深く感謝する。

引用文献

- Abraham, G.E. (1969) Solid-phase radioimmunoassay of estradiol-17 β . *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 29, 866-870.
- Adashi, E.Y. and Hsueh, A.J.W. (1981) Direct inhibition of testicular androgen biosynthesis revealing antigonadal activity of neurohypophysial hormones. *Nature, London*, 293, 650-652.
- Al-Dahash, S.Y.A. and David, J.S.E. (1977) The incidence of ovarian activity, pregnancy and bovine genital abnormalities shown by an abattoir survey. *Vet. Rec.* 101, 296-299.
- Alila, H.W. and Hansel, W. (1984) Origin of different cell types in the bovine corpus luteum as characterized by specific monoclonal antibodies. *Biol. Reprod.* 31, 1015-1025.
- Armstrong, D.T. and Hansel, W. (1959) Alteration of the bovine oestrous cycle with oxytocin. *J. Dairy Sci.* 42, 533-542.
- Borowski, U. (1972) Die Häufigkeit von Gelbkörperzysten bei Rindern aus dem Einzugsgebiet des Schlachthofs Delmenhorst. *Vet. med. Diss., Hannover*.
- Bosu, W.T.K. and Leslie, K.E. (1984) The effects of GnRH administration four days after insemination on first-service conception rate and corpus luteum function in dairy cows. *Proc. 10th Int. Cong. Animal Reprod. and AI., Urbana-Champaign, Illinois, III*, 309.
- Bulman, D.C. and Lamming, G.E. (1978) Milk progesterone levels in relation to conception, repeat breeding and factors influencing acycling in dairy cows. *J. Reprod. Fert.* 54, 447-458.
- Casida, L.E. (1961) Present status of the repeat-breeder cow problem. *J. Dairy Sci.* 44, 2323-2329.
- Cubick, P. (1972) Ein Beitrag zur Häufigkeit und Morphologie der Gelbkörperzysten bei Rindern im Einzugsbereich des Schlachthofes Hannover. *Vet. med. Diss., Hannover*.
- Dawson, F.L.M. (1959) The significance of cystic enlargement in the bovine corpus luteum. *Br. Vet. J.* 115, 46-55.
- Dawson, F.M.L. (1964) Report on infertility from persistent corpus luteum and cystic degeneration. *Proc. 5th Cong. Int. Reprod. Anim. and AI., Trento*, 7, 374-377.
- Diter, R. (1967) Die Funktion des Rindereierstocks als zuchterisch-konstitutionelles Leistungsmerkmal, zugleich ein tierärztlicher Beitrag zur Populationsgenetik. *Tierärztl. Umschau* 22, 554-560.

- 百目鬼 郁男・中原 達夫・山内 亮 (1975) 牛リビードブリーダーにおける授精前後の末梢血中遊離性ホルモンの消長. 家畜繁殖誌, 21, 57-64.
- Donaldson, L.E. and Hansel, W. (1965) Histological study of bovine corpora lutea. J. Dairy Sci. 48, 905-909.
- Donaldson, L.E. Hansel, W. and Van Vleck, L.D. (1965) The luteotropic properties of luteinizing hormone and the nature of oxytocin-induced luteal inhibition in cattle. J. Dairy Sci. 48, 331-337.
- Donaldson, L.E. and Hansel, W. (1968) Cystic corpora lutea and normal and cystic Graafian follicles in the cow. Aust. Vet. J. 44, 304-308.
- Donaldson, L.E. and Takken, A. (1968) The effect of exogenous oxytocin on corpus luteum function in the cow. J. Reprod. Fert. 17, 373-383.
- Dufour, J., Whitmore, H.L., Ginther, O.J. and Casida, L.E. (1972) Identification of the ovulating follicle by its size on different days of the estrous cycle in heifers. J. Anim. Sci. 34, 85-87.
- Elder, C. (1925) Studies on the corpus luteum. J. Am. Vet. Med. Ass. 67, 349-363.
- Erb, R.E., Estergreen, Jr. V.L., Gomes, W.R., Plotka, E.D. and Frost, O.L. (1968) Progesterin levels in corpora lutea and progesterone in ovarian venous and jugular vein blood plasma of the pregnant bovine. J. Dairy Sci. 51, 401-410.
- Erb, R.E., Garverick, H.A., Randel, R.D., Brown, B.L. and Callahan, C.J. (1976) Profiles of reproductive hormones associated with fertile and nonfertile inseminations of dairy cows. Theriogenology 5, 227-242.
- Erlanger, B.F., Borek, F., Beiser, S.M. and Lieberman, S. (1957) Steroid-protein conjugates. I. Preparation and characterization of conjugates of bovine serum albumin with testosterone and with cortisone. J. Biol. Chem. 228, 713-727.
- Estergreen, Jr. V.L., Frost, O.L., Gomes, W.R., Erb, R.E. and Bullard, J.F. (1967) Effect of ovariectomy on pregnancy maintenance and parturition in dairy cows. J. Dairy Sci. 50, 1293-1295.
- Flint, A.P.F. and Sheldrick, E.L. (1982) Ovarian secretion of oxytocin is stimulated by prostaglandin. Nature, London, 297, 587-588.
- Flint, A.P.F. and Sheldrick, E.L. (1983) Evidence for a systemic role for ovarian oxytocin in luteal regression in sheep. J. Reprod. Fert. 67, 215-225.
- Fogwell, R.L., Cowley, J.L., Wortman, J.A., Ames, N.K. and Ireland, J.J. (1985) Luteal function in cows following destruction of ovarian follicles at midcycle. Theriogenology, 23, 389-398.

- Foley, R.C. and Greenstein, J.S. (1958) Cytological changes in the bovine corpus luteum during early pregnancy. In: Symposium on Reproduction and Infertility., ed. F.X. Gassner, pp.88-96.
- Fujita, T. (1983) Messenger substances of neurons and paraneurons: their chemical nature and the routes and ranges of their transport to target. *Biomedical Research*, 4, 239-256.
- Gier, H.T. and Marion, G.B. (1961) The formation of the bovine corpus luteum. *J. Dairy Sci.* 44, 1187.
- Ginther, O.J. (1971) Response of corpora lutea to cauterization of follicles in sheep. *Am. J. Vet. Res.* 32, 59-62.
- Greenstein, J.S. (1960) Experimental induction of cystic corpora lutea in dairy cattle. *Int. J. Fert.* 6, 79-88.
- Gross, S.J. (1970) *Immunologic Methods in Steroid Determination.* eds. F.G. Peron and B.V. Cardwell, Meredith Corporation, New York, pp.41.
- Grunert, E. (1969) Gelbkörperzysten beim Rind und ihre Bedeutung als Sterilitätsfaktor. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 76, 668-672.
- Grunert, E. (1979) Zur Problematik der rektalen Ovarkontrolle beim Rind. *Prakt. Tierarzt* 60, Suppl. 13-16.
- Grunert, E. (1982) Ovarielle Dysfunction. In: *Fertilitätsstörungen beim Rind.* eds. E. Grunert und M. Berchtold, Verlag Paul Parey. pp.184-185.
- Guldenaar, S.E.F., Wathes, D.C. and Pickering, B.T. (1984) Immunocytochemical evidence for the presence of oxytocin and neurophysin in the large cells of the bovine corpus luteum. *Cell Tissue Res.* 237, 349-352.
- Hammond, J. (1927) *The physiology of reproduction in the cow.* Cambridge University Press, London, pp.35-41.
- Hansel, W. (1959) Female Infertility in Domestic Animals. *Fertil. Steril.* 10, 502-510.
- Hansel, W. (1964) Some observations on bovine cystic corpora lutea. *Proc. 5th Cong. Int. Reprod. Anim. and AI., Trento*, 7, 378-384.
- Hansel, W. (1981) Plasma hormone concentrations associated with early embryo mortality in heifers. *J. Reprod. Fert. Suppl.* 30, 231-239.
- Hansel, W. (1985) Advances in physiology of growth, reproduction and lactation. *Cornell Vet.* 75, 56-76.
- Hansel, W. and Wagner, W.C. (1960) Luteal inhibition in the bovine as a result of oxytocin injections, uterine dilatation, and intrauterine infusions of seminal and preputial fluid. *J. Dairy Sci.* 43, 796-805.

- Hoffmann, B. (1969) Gaschromatographische Bestimmung von Progesteron in Gewebe von Corpus-luteum-Zysten bei Kuhen. Dtsch. tierarztl. Wschr. 76, 287-289.
- Hoflinger, H. (1948) Das Ovar des Rindes in den verschiedenen Lebensperioden unter besonderer Berücksichtigung seiner funktionellen Feinstruktur. Acta anat. Suppl. 5.
- 本間 惣太・須川 章夫 (1960) 牛の黄体形成に伴う中心腔内液の存続期とその卵巢周期に及ぼす影響について. 家畜繁殖誌, 5, 127-132.
- Hornig, B. (1978) Untersuchungen über die Aussagesicherheit der an Ovarien durch rektale Kontrolle erhobenen Befunde beim Rind. Vet. med. Diss., Hannover.
- Horstmann, G. (1971) Histologische und histochemische Untersuchungen an Gelbkörperzysten des Rindes mit einem Vergleich zum kompakten Gelbkörper. Vet. med. Diss., Hannover.
- Horstmann, G., Neurand, K. und Schwarz, R. (1972) Lichtmikroskopische Untersuchungen an Corpus-luteum-Zysten des Rindes. Vet. Med. Nachr. 2, 116-121.
- Hsu, S.M., Raine, L. and Fanger, H. (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J. Histochem. Cytochem. 29, 577-580.
- Ireland, J.J., Coulson, P.B. and Murphree, R.L. (1979) Follicular development during four stages of the estrous cycle of beef cattle. J. Anim. Sci. 49, 1261-1269.
- Ireland, J.J., Fogwell, R.L., Oxender, W.D., Ames, K. and Cowley, J.L. (1984) Production of estradiol by each ovary during the estrous cycle of cows. J. Anim. Sci. 59, 764-771.
- Ireland, J.J., Murphee, R.L. and Colson, P.B. (1980) Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. J. Dairy Sci. 63, 155-160.
- Jordan, D. (1969) Vergleiche zwischen Befunden intra vitam und post mortem an Geschlechtsorganen von Rindern. Vet. med. Diss., München.
- 上見 幸司 (1977) 卵巢性ステロイドホルモンの免疫および酵素組織化学的研究. 慶応医学, 54, 584-597.
- Kami., Suzuki, T. and Mitsui, T. (1978) Localization of immunoreactive female steroids in ovarian and placental tissue. Okajimas Folia Anat. Jpn. 55, 265-288.
- 金田 義宏・松田 一男 (1970) 乳牛における嚢腫様黄体に対する 2,3 の処置について. 家畜繁殖誌, 15, 134-138.

- 金田 義宏・百目鬼 郁男・中尾 達男 (1980) 乳牛の嚢腫様黄体に対する 2、3の処置が黄体形成及び受胎に及ぼす影響. 家畜繁殖誌, 26, 37-42.
- Karsch, F.J., Noveroske, J.W., Roche, J.F., Norton, H.W. and Nalbandov, A.V. (1970) Maintenance of ovine corpora lutea in the absence of ovarian follicles. *Endocrinology* 87, 1228-1236.
- Kawaoui, A. and Okano, T. (1977) Immunohistochemical Localization of steroid hormones. II. Detection of progesterone in cultured mouse adenocortical cells. *Acta Histochem. Cytochem.* 10, 145.
- Koos, R.D. (1978) Progesterone synthesis by bovine corpus luteum cells separated by unit gravity sedimentation. *Biol. Reprod.* 18, Suppl. 1, 78A, 173.
- Koos, R.D. and Hansel, W. (1981) The large and small cells of the bovine corpus luteum: Ultrastructural and functional differences. In: *Dynamics of Ovarian Function*, eds. N.B. Scharf and M. Hunzicker-Dunn, Raven Press, New York, pp.197-203.
- Kruip, Th. A.M., Vullings, H.G.B., Schams, D., Jonis, J. and Klarenbeek, A. (1985) Immunocytochemical demonstration of oxytocin in bovine ovarian tissues. *Acta endocrinol.* 109, 537-542.
- Krupski, A. (1917) Beitrage zur Physiologie der weiblichen Sexualorgane des Rindes. *Schweiz. Arch. Tierhk.* 59, 19-25.
- Makino, T. (1973) Radioimmunoassay of plasma sex steroid. *Folia endoc. Japonica* 20, 629-646.
- Malven, P.V., Hansel, W., Wagner, W.C. and Roberts, S.J. (1963) Estrogenic activity in bovine luteal cyst fluid. *J. Dairy Sci.* 46, 995-996.
- Matton, P., Adalakoun, V., Couture, Y. and Dufour, J.J. (1981) Growth and replacement of the bovine ovarian follicles during the estrous cycle. *J. Anim. Sci.* 52, 813-820.
- Maurer, R.R. and Echternkamp, S.E. (1982) Hormonal asynchrony and embryonic development. *Theriogenology* 17, 11-22.
- McDonald, L.E., McNutt, S.H. and Nichols, R.E. (1953) On the essentiality of the bovine corpus luteum of pregnancy. *Am. J. Vet. Res.* 14, 539-541.
- McEntee, K. (1958) Cystic corpora lutea in cattle. *Int. J. Fert.* 3, 120-126.
- McNutt, G.W. (1924) The corpus luteum of ox ovary in relation to the estrous cycle. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 66, 556-597.
- Mirecka, J. (1974) Application of the anti-progesterone antibody for immunohistochemical demonstration of progesterone. *Acta histochem.* 51, 205-213.

- Mirecka, J. (1975) Immunofluorescent localization of the female sex steroids in the porcine ovary. *Histochemical Journal*, 7, 249-257.
- Morrow, D.A., Roberts, S.J., McEntee, K. and Gray, H.G. (1966) Postpartum ovarian activity and uterine involution in dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 149, 1596-1609.
- Moss, S., Wrenn, T.R. and Sykes, J.F. (1954) Some histological and histochemical observations of the bovine ovary during the estrous cycle. *Anat. Rec.* 120, 409-433.
- Mylrea, P.J. (1962) Macroscopic lesions in the genital organs of cows. *Aust. Vet. J.* 38, 457-461.
- Nakao, T. (1980) Practical procedure for enzyme immunoassay of progesterone in bovine serum. *Acta endocrinol.* 93, 223-227.
- 中尾 敏彦・杉橋 章義・守野 繁・森野政晴・河田啓一郎 (1986) 乳牛の人工授精後における乳汁中progesterone濃度の変動と受胎との関係(予報). *日獣会誌*, 38, 717-721.
- Okuda, K. (1982) Morphologische und endokrinologische Untersuchungen am Corpus luteum periodicum und graviditatis des Rindes. *Vet. med. Diss. Munchen*.
- Okuda, K., Kleeberg-Ruppert, S. and Leidl, W. (1984) Histologische und hormonelle Untersuchungen am Corpus luteum periodicum des Rindes. *Zuchthyg.* 19, 169-181.
- 奥田 潔・佐藤邦忠・小野 齊・三宅 勝 (1981) ウシ黄体の形態学的所見と血清中progesterone値との関係. *帯大研報*, 12, 115-124.
- Pierson, R.A. and Ginther, O.J. (1984) Ultrasonography for detection of pregnancy and study of embryonic development in heifers. *Theriogenology* 22, 225-233.
- Priedkalns, J., Weber, A.F. and Zemjanis, R. (1968) Qualitative and quantitative morphological studies of the cells of the membrane granulosa, theca interna and corpus luteum of the bovine ovary. *Zschr. Zellforsch.* 85, 501-520.
- Rajakoski, E. (1960) The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical and left-right variations. *Acta endocrinol.* 34, Suppl. 52, 1-68.
- Remsen, L.G., Roussel, J.D. and Karihaloo, A.K. (1982) Pregnancy rates relating to plasma progesterone levels in recipient heifers at day of transfer. *Theriogenology* 17, 105.
- Resende, J., Megale, F., Do Vale Filho, V.R. and De Souza Garcia, O. (1972) Prevalence of cystic corpora lutea in slaughtered zebu cows. *Args. Esc. Vet. Minas Gerais* 24, 115-117.

- Roche, J.F., Ireland, J.J. and Boland, M.P. (1985) Concentrations of luteinising hormone and progesterone in pregnant and non-pregnant heifers. *Vet. Rec.* 116, 153-156.
- Rodgers, R.J., O'shea, J.D., Findlay, J.K., Flint, A.P.F. and Sheldrick, E.L. (1983) Large luteal cells: The source of luteal oxytocin in the sheep. *Endocrinology* 113, 2302-2304.
- Schams, D., Prokopp, S. and Barth, D. (1983) The effect of active and passive immunization against oxytocin on ovarian cyclicity in ewes. *Acta endocrinol.* 103, 337-344.
- Sheldrick, E.L., Mitchell, M.D. and Flint, A.P.F. (1980) Delayed luteal regression in ewes immunized against oxytocin. *J. Reprod. Fert.* 59, 37-42.
- Snook, R.B., Brunner, M.R., Saatmen, R.R. and Hansel, W. (1969) The effect of antisera to ovine LH in hysterectomized and intact heifers. *Biol. Reprod.* 1, 49-58.
- Staigmiller, R.B. and England, B.G. (1982) Follicular in the bovine. *Theriogenology* 17, 43-52.
- Staples, R.E. and Hansel, W. (1961) Luteal function and embryo survival in the bovine. *J. Dairy Sci.* 44, 2040-2048.
- Staples, R.E., McEntee, K. and Hansel, W. (1961) Luteal function as related to pituitary and ovarian cytology and embryo development in the bovine. *J. Dairy Sci.* 44, 2049-2057.
- Stock, A. (1984) Die Luteinzellkultur als Modell zur Untersuchung der Progesteronsekretion von Corpora lutea und Corpus luteum-Zysten beim Rind. *Vet. med. Diss. Munchen.*
- Stock, A. (1985) Zur Progesteronfreisetzung der Gelbkörperzyste des Rindes. *Tierärztl. Umschau* 40, 477-482.
- 菅 徹行・正木 淳二・川口 政司 (1975) 牛の子宮分泌に関する研究. XI. 不妊牛の子宮内における糖および糖アルコールの濃度. *家畜繁殖誌*, 21, 83-88.
- Theissen, P. (1970) Physiologische und pathologische Ovarialbefunde an Schlachtorganen des Rindes. *Vet. med. Diss. Hannover.*
- Thweites, C.J. and Edey, T.N. (1970) Histology of the corpus luteum in the ewe: changes during the estrous cycle and early pregnancy, and in response to some experimental treatments. *Am. J. Anat.* 129, 439-448.
- Ueberschäre, S. (1961) Zur makroskopischen und mikroskopischen Altersbestimmung am Corpus luteum des Rindes. *Vet. med. Diss. Hannover.*
- Ursely, J. and Leymarie, P. (1979) Varying response to luteinizing hormone of two luteal cell types isolated from bovine corpus luteum. *J. Endocrinol.* 83, 303-310.

- Wagner, W.C. (1962) Improving fertility in dairy cows. J. Am. Vet. Med. Ass. 140, 939-942.
- Wathes, D.C. and Swann, R.W. (1982) Is oxytocin an ovarian hormones ? Nature, London, 297, 225-227.
- Wendorf, G.L., Lawyer, M.S. and First, N.L. (1983) Role of adrenals in the maintenance of pregnancy in cows. J. Reprod. Fert. 68, 281-287.
- Williams, J.A. (1983) Mechanisms in Hormone Secretion, Action, & Response. In: Basic & Clinical Endocrinology. eds. F.S. Greenspan and P.H. Forsham, Lange medical Publications, USA, pp.1-17.
- Williams, W.W. (1964) Cystic and retained corpora lutea of cattle. Proc. 5th Cong. Int. Reprod. Anim. and AI., Trento, 7, 387-390.
- Zimbelman, R.G., Loy, R.G. and Casida, L.E. (1961) Variations in some biochemical and histological characteristics of bovine corpora lutea during early pregnancy. J. Anim. Sci. 20, 99-105.

Study on Cystic Corpus Luteum in Cattle

Kiyoshi OKUDA

SUMMARY

Although results of many studies suggest that cystic corpora lutea may be a cause of infertility in cattle, relatively little specific information concerning these structures is available. The aim of this work is to reveal whether or not there is a relationship between the influence of the cavity in corpus luteum on luteal function and infertility in cattle.

Seven hundred six bovine corpora lutea in various stages from a slaughterhouse were examined morphologically and endocrinologically. The immunohistochemical technique was adopted to investigate the ability of producing progesterone and oxytocin by luteal cells in corpus luteum with and without a central cavity. In addition an ultrasonic scanner was used for sequential in vivo monitoring of a central cavity in the corpus luteum to study directly the influence of the cystic corpus luteum on sexual cycle and pregnancy rate in cattle. Results obtained here are summarized as follows.

I. Morphological and Endocrinological Observation of Cystic Corpus Luteum

(1) In materials from the slaughterhouse, the central cavity was found in 42.1% (80/190) of developing corpora lutea, 33.7% (126/374) of fully developed corpora lutea, and 11.1% (7/63) of corpora lutea in regression, showing that nearly half of corpora lutea have a cavity immediately after ovulation. By ultrasonic observation these cavities were largest at Day 10 after ovulation and most of them disappeared gradually approaching the next estrous cycle. Four corpora lutea of pregnancy with a central cavity were found. One of them had a size of 19 mm.

(2) Ovaries with corpora lutea formed a central cavity in the developing phase. They showed significantly more midcycle follicles but there was no significant difference between the ovaries with fully developed corpora lutea with a central cavity and those without a central cavity. It is suggested that midcycle follicles appear physiologically and that there is no relationship between the cavity appearance and infertility.

(3) Luteal cells were classified morphologically into five types (Type I-V), and the proportion of each luteal cell type was examined in fully developed corpora lutea with and without a central cavity. The proportion of luteal cell Type I was higher in corpora lutea with a central cavity than without a cavity, but a reverse proportion in luteal cell Type II. However, there was no significant difference in the proportions of luteal cells added Type I and Type II between the fully developed corpora lutea with and without a central cavity. Therefore, there is no difference between luteal functions of both groups.

(4) In fully developed corpora lutea, the concentration of progesterone in the luteal tissue was significantly lower in corpora lutea with a central cavity than those without a central cavity suggesting that corpora lutea with a central cavity produce less progesterone than those without a cavity. But at Day 10 after artificial insemination, there was no significant difference between the serum concentration of progesterone from the cows having a corpus luteum with and without a central cavity. This shows that there is no marked difference in progesterone-secreting function between corpora lutea with and without a central cavity.

II. Immunohistochemical Studies on Progesterone-and Oxytocin-immunoreactive Cells in the Cystic Corpus Luteum

(1) For the examination of the specificity of anti- 11α -hydroxyprogesterone-hemisuccinate-bovine serum albumin-rabbit serum (anti-P) at the immunohistochemical level, the absorption test was performed with progesterone, pregnenolone and 17α -hydroxyprogesterone. It was found that the immunostaining property was almost completely abolished by progesterone, slightly affected by pregnenolone and hardly influenced by 17α -hydroxyprogesterone. It is suggested that luteal cells producing progesterone could be revealed by this method.

(2) Both large and small luteal cells stained positively for anti-P in immunohistochemistry, suggesting that both cells showed slender cytoplasmic processes suggesting paracrine mode of secretion.

(3) In the fully developed corpora lutea with and without a central cavity, all the luteal cells reacted positively for anti-P and the large and small luteal cells stained positively for anti-oxytocin. These results indicate that the appearance of a central cavity does not influence the production of progestins and oxytocin by luteal cells.

(4) Using serial sections it was found that the same luteal cells reacted both for anti-P and anti-oxytocin. It is suggested that the luteal cells may produce both progestins and oxytocin.

III. Influence of the Cystic Corpus Luteum on Sexual Cycle and Pregnancy Rate

(1) When using the ultrasonic scanner, 12 cows that returned to estrus once or twice were re-examined for appearance of the cavity in corpus luteum. The central cavities were observed in only 2 of 12 cows during two continuous cycles and no cavity was observed in no cows during three continuous cycles. This result shows clearly that the central cavity in corpus luteum

appears temporarily and cannot cause "repeat breeding".

(2) The number of days that cows returned to estrus after artificial insemination was not significantly different between two groups of cows with and without a central cavity in corpus luteum. Thirty-three percent of both groups of cows returned to estrus at Day 30 after artificial insemination. These results indicate that there may not be a relationship between a cystic corpus luteum and the early embryonic death.

(3) There was no significant difference in pregnancy rate between the two groups of cows with and without a central cavity. Cows with a large central cavity of more than 15mm in size and cows without a central cavity in corpus luteum showed 58.6% and 57.1% pregnancy rate, respectively.

These results show clearly that even cows with a large central cavity in corpus luteum can concept and maintain the pregnancy.